

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 58 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2559 Vol. 58 No. 4 October - December 2016

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่
ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	นางจุรีภรณ์ บุญยวงศ์โรจน์ นพ.พิเชษฐ บัญญัติ
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ศ.เกียรติคุณ นพ.ประเสริฐ ทองเจริญ ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ. ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อิ่มเอิบ	ดร.ปนัดดา ชิลวา พญ.มยุรา กุศลมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ. ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์	
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	ดร.เลาจนา เขาวนาดีชัย	
คณะบรรณาธิการ	ศ. ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ. ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ รศ. ดร. ภญ.พิณทิพย์ พงษ์เพชร ดร.दनัย ทิวาเวช นางหรรษา ไชยวานิช ดร.เดือนถนอม พรหมขัติแก้ว ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณนะ นางกนกพร อธิสุข ภญ. ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา	ศ. ดร.อรษา สุตเธียรกุล ศ. พญ.พรรณิ ปิติสุทธิธรรม ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ นางสุวรรณา จารุณช ดร. นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ นางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธ์ ดร.อุษาวดี ถาวระ นายศิริ ศรีมนโรถ นางวิชชุดา จริยะพันธุ์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์	
กำหนดออก อัตราสมาชิก	ราย 3 เดือน ในประเทศปีละ 200.- บาท ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา	
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	หจก. อรุณการพิมพ์ 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 58 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2559

Vol. 58 No. 4 October - December 2016

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit Centrifuge ของหน่วยบริการปฐมภูมิ ในจังหวัดพิษณุโลก	221
จุฑา ดาว บุษยยอด นพดล เปี่ยมศิริ อโณทัย ศรีตนไชย และณัฐพัชร์ รัตนเดชานาคินทร์	
การพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซิน	229
สารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน ในนมผงโดย HRGC/HRMS	
สุพัฒน์ แสงสวัย ศิริชัย สัญญะ และสิรินทรนิชา สีมาชัยสิน	
การพัฒนาระบบรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข	246
เรวดี ลิริธัญญานนท์ ชมโฉไล สันธูสาร จุไร โชติชนาทวีวงศ์ และวาสิฏฐี แก้วกระจ่าง	
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอล	257
แอนติบอดีต่อเอนไซม์แลคเตทไฮโดรจีเนสของพลาสมิดเทียมฟิลิซพาร์มในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	
ปนัดดา เทพอัศร อภิชัย ประชาสุภาพ ดวงรัตน์ จุลอักษร อณิชา เลื่องชัยเชวง	
สกุลรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์ และพรทิพย์ ไชยยะ	
การศึกษาคุณภาพของหัวตองดึง	270
ทัศนีย์ ปานผดุง สายใจ ปริยะวาทิ สายัน ชุนนุช และณฤมล บุญราศรี	
การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต	283
ด้วยวิธี UPLC	
นพนันท์ วงศ์นากิจเจริญกุลธิดา อำพันธ์ทอง และบรรจง กิตติรัตน์ตระกูล	
ดัชนีชื่อผู้นิพนธ์	293
ดัชนีชื่อเรื่อง	297

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 58 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2559

Vol. 58 No. 4 October - December 2016

CONTENTS

Page

Original Articles

- Performance Evaluation of Microhematocrit centrifuge
in the Primary Care Units in Phitsanulok Province** 221
*Dujdao Boonyod Noppadol Piamsiri Anothai Sritonchai
and Natthaphat Ratanadachanakin*
- Method Development and Validation for Analysis of Dioxins,
Dioxin-like PCBs and Non Dioxin-Like PCBs in Milk Powder
by HRGC/HRMS** 229
Supat Sangsuay Sirichai Sunya and Sirinnicha Seemachaisin
- Development of Medical Laboratory Certification System According
to Ministry of Public Health Standard** 246
*Raevadee Siritunyanont Chomchailai Sinthusarn Jurai Chotichanathawewong
and Wasittee Kaewkrajang*
- Transfection Optimization for Expression of the Recombinant
Monoclonal Antibody against *Plasmodium falciparum* Lactate
Dehydrogenase in Mammalian Cells** 257
*Panadda Dhepakson Apichai Prachasuphap Duangrat Jullaksorn
Anicha Luengchaichaweng Sakulrat Soonthornchattrawat and Porntip Chaiya*
- Quality Study of Dried Dong-Dueng Tuber (*Gloriosa superba* Linn.)** 270
*Tassanee Panphadung Saijai Pariyawatee Sayan Koonnoot
and Narumon Boonrasri*
- UPLC Method Development and Validation for Determination
of Timolol Maleate in Ophthalmic Solution** 283
Napanan Wongthanakitcharoen Kulthida Ampantong and Banjong Kitirattrakran
- Author Index** 293
- Title Index** 297



บทบรรณาธิการ



วันพฤหัสบดีที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2559 เวลา 15.52 นาฬิกา ประชาชนชาวไทยทุกคนหัวใจสลาย เมื่อพระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มหิตลาธิเบศรรามาธิบดี จักรีนฤพดินทร สยามินทราธิราช บรมนาถบพิตร เสด็จสวรรคต หลังจากที่ทรงพระประชวรและทรงเข้ารับการรักษาพระอาการที่โรงพยาบาลศิริราช

ด้วยความสำนึกในพระมหากรุณาธิคุณที่พระองค์ทรงทุ่มเทพระวรกาย ทรงงานอย่างหนักไม่เว้นแม้ในขณะที่ทรงพระประชวรอยู่ เพื่อประโยชน์สุขแก่ประชาชนชาวไทยตลอดระยะเวลา 70 ปีที่ทรงครองราชย์ เป็นพระมหากษัตริย์รัชกาลที่ 9 แห่งพระบรมราชจักรีวงศ์ ประชาชนทุกหมู่เหล่าและหน่วยงานทั้งภาครัฐและภาคเอกชน จึงได้พร้อมใจกันจัดกิจกรรมหลากหลายเพื่อเทิดพระเกียรติและถวายเป็นพระราชกุศลแด่พระองค์ท่าน

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะที่เป็นหน่วยงานราชการภายใต้สังกัดกระทรวงสาธารณสุข ได้จัดกิจกรรมหลายรูปแบบ เพื่อผู้บริหารและเจ้าหน้าที่ได้มีโอกาสร่วมกันน้อมเกล้าน้อมกระหม่อมรำลึกในพระมหากรุณาธิคุณของพระองค์ท่านที่มีต่อปวงชนชาวไทย ตลอดจนการน้อมนำแนวทางตามพระบรมราโชวาท พระราชดำรัส และพระราชดำริที่ได้เคยพระราชทานไว้ มาเป็นเครื่องยึดเหนี่ยวในการปฏิบัติหน้าที่ราชการ เพื่อประโยชน์ต่อประชาชนและประเทศชาติสืบไป ซึ่งหนึ่งในกิจกรรมที่จัดขึ้น ได้แก่ การประกวดบทร้อยกรองเทิดพระเกียรติในงาน “น้อมรำลึกพระมหากรุณาธิคุณพระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช” บรรณาธิการจึงขอเสนอบทร้อยกรองที่ชนะเลิศในการประกวดครั้งนี้ เพื่อแสดงความสำนึกในพระมหากรุณาธิคุณเป็นล้นพ้นอันหาที่สุดมิได้

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์รำพันส่ง
น้อมสำนึกในพระคุณบุญคุณครบครัน
พระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช
ทุกโครงการเหนือเกล้าเทวาทวี
ยามหน้าแล้งมีฝนหลวงร่วงสัมฤทธิ์
ปานน้ำดินทรงระดมสร้างสมดุล
ขอน้อมเกล้าน้อมกระหม่อมน้อมอุทิศ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พร้อมอาลัย

เทิดพระองค์อำไพไพทสวรรณต์
ระลึกมั่นในพระมหาบารมี
ทรงวิเศษสุดประเสริฐเลิศราศี
สดุดีด้วยพระมหากรุณาธิคุณ
เศรษฐกิจพอเพียงเคียงเกื้อหนุน
ทรงเจือจุนแพทย์อาสาประชาไทย
ธ สถิตสู่สวรรค์สว่างไสว
ร้อยเรียงใจถวายรักภักดีเทอญ

ปวงข้าพระพุทธเจ้าขอน้อมเกล้าน้อมกระหม่อมรำลึกในพระมหากรุณาอันหาที่สุดมิได้

ข้าพระพุทธเจ้า นางสาววีรวรรณ ทศนภิญโญ นักวิเคราะห์นโยบายและแผน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้ประพันธ์

นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์
บรรณาธิการ

การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ของหน่วยบริการปฐมภูมิ ในจังหวัดพิษณุโลก

ดวงดาว บุญยอด นพดล เปี่ยมศิริ อโณทัย ศรีตนไชย และณัฐพัชร์ รัตนเดชนาคินทร์
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ การตรวจหาปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) เป็นการทดสอบขั้นพื้นฐานที่มีให้บริการในหน่วยบริการปฐมภูมิ โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ประสิทธิภาพเครื่องมือตามเกณฑ์มาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข สำหรับหน่วยบริการเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลการตรวจ ดังนั้นเพื่อให้มั่นใจในผลการทดสอบ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก จึงได้จัดทำโครงการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ของหน่วยบริการปฐมภูมิ จังหวัดพิษณุโลก ประจำปี 2557 โดยตรวจสอบเครื่องมือของหน่วยบริการระดับอำเภอ รวมทั้งหมด 140 เครื่อง จาก 120 หน่วยบริการ พบว่าผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ ทั้งความเร็วรอบในการหมุนและเวลา ร้อยละ 75.7 และไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน ร้อยละ 24.3 Parameter ที่พบเกิดจากเครื่องตั้งเวลา และความเร็วรอบในการหมุนไม่ได้ตามช่วงที่ใช้งาน เนื่องจากเครื่องเก่าชำรุด และขาดการบำรุงรักษา ส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบทำให้แปลผลผิดพลาดได้ ดังนั้นเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบการตรวจทางห้องปฏิบัติการของหน่วยบริการปฐมภูมิควรมีการวางแผนในการตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ผลการตรวจมีความถูกต้อง

บทนำ

กระทรวงสาธารณสุข มีนโยบายที่จะพัฒนาระบบบริการสุขภาพของหน่วยบริการทุกระดับให้สามารถบริการสุขภาพที่บูรณาการและเชื่อมโยงกัน รวมทั้งการพัฒนาหน่วยบริการปฐมภูมิ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) ศูนย์สุขภาพชุมชนเมือง (ศสม.) ซึ่งมีการกิจด้านการส่งเสริมสุขภาพ ฟื้นฟูสุขภาพ ป้องกันโรค รักษาพยาบาล และการคุ้มครองผู้บริโภค

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีบทบาทหน้าที่เป็น National Health Authority ด้านห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศ ได้จัดทำเกณฑ์พัฒนาหน่วยบริการปฐมภูมิ เรื่อง ระบบคุณภาพและมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุข สำหรับหน่วยบริการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) และศูนย์สุขภาพชุมชนเมือง (ศสม.)⁽¹⁾ ซึ่งมีบริการทดสอบพื้นฐานที่จำเป็น ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์น้ำตาลในเลือดจากปลายนิ้ว การตรวจวิเคราะห์น้ำตาลและโปรตีนในปัสสาวะ การตรวจวิเคราะห์การตั้งครรภ์ และการตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hematocrit) ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามเกณฑ์ดังกล่าวว่าเครื่องมือที่ส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบต้องมีการสอบเทียบเพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้อง ประชาชนเข้าถึงบริการสุขภาพที่มีคุณภาพเท่าเทียมกัน

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก มีภารกิจหลักในการนำนโยบายมาสู่การปฏิบัติ โดยได้ดำเนินการพัฒนาระบบคุณภาพหน่วยบริการปฐมภูมิอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2555 จนถึงปัจจุบัน จากผลการประเมินตามเกณฑ์พัฒนาหน่วยบริการปฐมภูมิ เรื่อง ระบบคุณภาพและมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุข สำหรับหน่วยบริการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) และศูนย์สุขภาพชุมชนเมือง (ศสม.) พบปัญหาระบบคุณภาพของหน่วยปฐมภูมิทุกแห่งในด้านการสอบเทียบเครื่องมือโดยเฉพาะเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit Centrifuge ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ซึ่งเป็นการทดสอบขั้นพื้นฐานในการให้บริการของหน่วยบริการปฐมภูมิ และเป็นข้อมูลที่แพทย์ใช้ในการประเมินภาวะซีดของผู้ป่วย หากเครื่องมือดังกล่าวไม่มีการสอบเทียบอาจส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของการทดสอบหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit)⁽²⁾ ดังนั้นกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก จึงได้จัดทำโครงการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ของหน่วยบริการปฐมภูมิในจังหวัดพิษณุโลก ในเขตสุขภาพ 2 ประจำปีงบประมาณ 2557 โดยนำร่องที่จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นที่ตั้งของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ในหน่วยบริการปฐมภูมิ จังหวัดพิษณุโลก ระยะเวลาดำเนินงานเดือนกุมภาพันธ์ ถึงสิงหาคม 2557 นำผลจากการประเมินในครั้งนี้มากำหนดแนวทางในการพัฒนาระบบคุณภาพในเขตสุขภาพที่ 2 เพื่อให้เกิดการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่อง และประชาชนได้รับบริการที่ถูกต้อง มีคุณภาพ ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มเป้าหมาย

เครื่องหมุนเหวี่ยงของโรงพยาบาลแม่เครือข่ายระดับอำเภอ (Contracting Unit for Primary care, CUP) 9 เครื่อง และจากหน่วยบริการปฐมภูมิ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล และศูนย์สุขภาพชุมชนเขตเมืองในจังหวัดพิษณุโลก 120 แห่ง จำนวน 140 เครื่อง

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องวัดความเร็วรอบ (Tachometer testo Model C.A.25 Serial no.N129150 YGV)

สติ๊กเกอร์สะท้อนแสง

เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น (Hygrometer รุ่น Testo 608-H1)

อนาล็อก มัลติมิเตอร์ (Analog Multimeter) Sanwa YX-360TR

นาฬิกาจับเวลา Stop watch CANON CT-20

วิธีดำเนินงาน

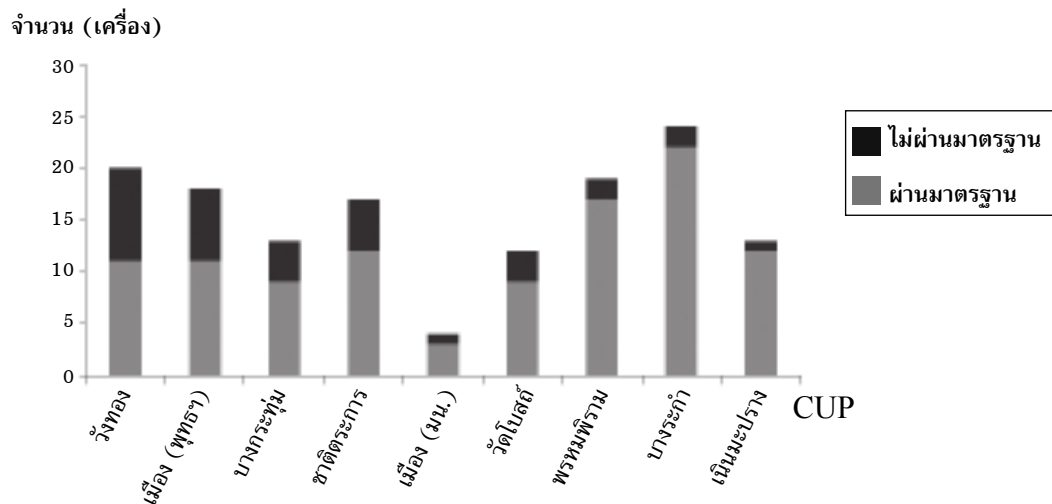
1. ประชุมชี้แจงการดำเนินงานที่มอบเทียบ กำหนดแผนปฏิบัติการและประสานงานกับโรงพยาบาลแม่เครือข่ายระดับอำเภอ ในการลงพื้นที่เครือข่ายระดับอำเภอ (Contracting Unit for Primary care, CUP) เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพเครื่องมือ จัดเตรียมวัสดุ/อุปกรณ์ให้พร้อม จัดส่งเครื่องมือวัดความเร็วรอบในการหมุน Tachometer testo Model C.A.25 ไปสอบเทียบกับหน่วยงานที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และนำนาฬิกาจับเวลา Stop watch CANON สอบเทียบเวลามาตรฐานจากหน่วยงานกรมอุทกศาสตร์ ทหารเรือ <http://www.hydro.navy.mi.th/TIME/>

2. ลงพื้นที่เพื่อทำการประเมินประสิทธิภาพและบันทึกผล โดยปฏิบัติตามมาตรฐานเครื่องมือวิทยาศาสตร์⁽³⁾ ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ สภาพเครื่อง ความปลอดภัยตรวจสอบสายดิน วัดอุณหภูมิและความชื้นด้วย Hygrometer และตรวจสอบระบบการจ่ายไฟด้วยมัลติมิเตอร์ (Multimeter) สอบเทียบความเร็วรอบในการหมุน (Round per minutes, rpm) ด้วยเครื่องวัดความเร็วรอบ (Tachometer testo Model C.A.25) เป็นเครื่องมือมาตรฐาน ซึ่งได้รับการรับรองจากห้องปฏิบัติการสอบเทียบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องตั้งเวลาในย่านที่ใช้งานด้วยนาฬิกาจับเวลา (stop watch) CANON โดยทำการเทียบเวลาจากกรมอุทกศาสตร์ ทหารเรือ ทำซ้ำ 3 รอบ แล้วนำค่าเฉลี่ยเทียบกับค่าอ้างอิง คำนวณค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อน (error) นำข้อมูลที่ได้นำวิเคราะห์และประเมินผลเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ซึ่งกำหนดให้มีความคลาดเคลื่อนจากค่าเป้าหมายตามย่านความถี่ที่ใช้งานยอมรับได้ไม่เกินร้อยละ 10⁽³⁻⁵⁾ ทั้งความเร็วรอบในการหมุนและเวลา

3. จัดทำรายงานผลการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยง และจัดทำแผนงานโครงการเพื่อรองรับการดำเนินงานให้ครอบคลุมทั้ง 5 จังหวัด ในเขตสุขภาพที่ 2 เพื่อให้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

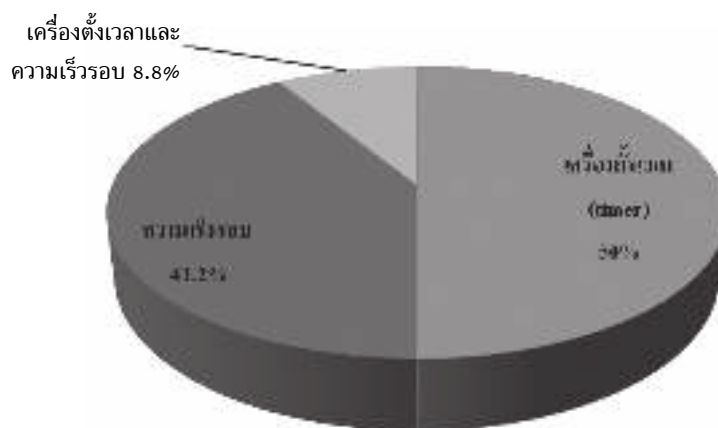
ผล

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ในหน่วยบริการปฐมภูมิ จังหวัดพิษณุโลก ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวน 140 เครื่อง จาก 120 หน่วยบริการปฐมภูมิที่มีการทดสอบหาปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) จำแนกเป็นเครื่องที่ผลิตในประเทศไทย และมอเตอร์เป็นชนิดใช้แปรงถ่าน จำนวน 60 เครื่อง หรือร้อยละ 42.9 ส่วนเครื่องที่ผลิตและนำเข้าชนิดใช้ฟิวส์ 80 เครื่อง หรือร้อยละ 57.1 พบว่าเครื่องมือผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน 106 เครื่อง หรือร้อยละ 75.7 และไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน 34 เครื่อง หรือร้อยละ 24.3 (ตารางที่ 1) เครือข่ายอำเภอเนินมะปราง มีเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานมากที่สุด โดยเทียบตามสัดส่วนของเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ดูแลทั้งหมด และไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานมากที่สุดที่อำเภอวังทอง รองลงมา ได้แก่ เครือข่ายอำเภอเมือง (โรงพยาบาลพุทธชินราช) บางกระทุ่ม ชชาติตระการ วัดโบสถ์ และเมือง (โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร) พรหมพิราม บางระกำ และเนินมะปราง จำนวน 9, 7, 4, 5, 1, 3, 2, 2 และ 1 เครื่องคิดเป็นร้อยละ 45, 38.9, 30.8, 29.4, 25, 25, 10.5, 8.3 และ 7.7 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge แยกตามเครือข่ายอำเภอ (CUP)

เมื่อพิจารณาแยกตาม Parameter ของเครื่องที่ไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน ส่วนมากเป็นเครื่องที่ผลิตในประเทศไทย จำนวน 32 เครื่อง นำเข้า 2 เครื่อง เครื่องตั้งเวลาเป็น Parameter พบมากที่สุด รองลงมาเป็นความเร็วรอบในการหมุน และพบทั้งสอง Parameter จำนวน 17, 14 และ 3 เครื่อง คิดเป็นร้อยละ 50, 41.2 และ 8.8 ตามลำดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 Parameter ของเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ที่ไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge แยกตามรายอำเภอ/CUP

อำเภอ/CUP	จำนวน (เครื่อง)	จำนวนผ่านมาตรฐาน (เครื่อง)	จำนวนไม่ผ่านมาตรฐาน (เครื่อง)
1. วังทอง	20	11	9
2. เมือง (โรงพยาบาลพุทธชินราช)	18	11	7
3. บางกระทุ่ม	13	9	4
4. ชชาติตระการ	17	12	5
5. เมือง (โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร)	4	3	1
6. วัดโบสถ์	12	9	3
7. พรหมพิราม	19	17	2
8. บางระกำ	24	22	2
9. เนินมะปราง	13	12	1
รวม	140	106	34

วิจารณ์

การตรวจสอบประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit Centrifuge จำนวน 140 เครื่อง จาก 120 แห่งที่มีเครื่องมือดังกล่าวในบางแห่งมีมากกว่าหนึ่งเครื่อง เนื่องจากเป็นหน่วยบริการซึ่งดูแลประชากรหนาแน่น อาทิ ศูนย์สุขภาพชุมชนเมือง และโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลขนาดใหญ่ บางเครื่องได้รับมาจากโครงการอื่นๆ บางเครื่องไม่มีการบันทึกประวัติ ไม่มีเลขครุภัณฑ์ ไม่เคยมีการใช้งาน บางเครื่องไม่เคยมีการสอบเทียบ บางเครื่องมีการสอบเทียบแต่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งทำให้ขาดความชัดเจนในรายละเอียดต่างๆ หากแบ่งตามประเภทจากแหล่งการผลิต พบเป็นเครื่องที่ผลิตในประเทศไทย และมอเตอร์เป็นชนิดใช้แปรงถ่าน (carbon brush/brush drive) จำนวน 60 เครื่อง หรือร้อยละ 42.9 ผลิตและนำเข้าจากต่างประเทศ เป็นชนิดใช้ฟิวส์ 80 เครื่อง หรือร้อยละ 57.1 พบว่าผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ 106 เครื่อง หรือร้อยละ 75.7 และไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานจำนวน 34 เครื่อง หรือร้อยละ 24.3 ซึ่งเป็นเครื่องที่ผลิตในประเทศมากที่สุด จำนวน 32 เครื่อง และเป็นเครื่องที่นำเข้าจำนวน 2 เครื่อง

ในจำนวน 34 เครื่อง ที่สอบเทียบไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานเครื่องมือแพทย์นั้น พบกระจายในทุกอำเภอ หากวิเคราะห์แยกตาม Parameter ได้ดังนี้ เครื่องตั้งเวลาเป็น Parameter ที่พบมากที่สุด ซึ่งเป็นรุ่นที่ผลิตในประเทศ ใช้แบบสปริงขดลวดในการตั้งเวลาใช้งาน อาจจะมีสาเหตุจากเครื่องเก่าและมีอายุการใช้งานมาก ขาดการบำรุงรักษา ทำให้สปริงลวดยืดขยาย ส่งผลให้เวลาที่ตั้งไม่ตรงกับเวลาที่ใช้งาน Parameter ที่พบรองลงมาคือความเร็วรอบ ส่วนใหญ่เป็นเครื่องรุ่นที่ผลิตในประเทศ มอเตอร์เป็นชนิดใช้แปรงถ่าน (brush drive/carbon brush) อาจจะมีสาเหตุจากแปรงถ่านเหลือน้อย หน้าสัมผัสแปรงถ่านไม่เรียบหรือสกปรก ซึ่งทำหน้าที่เป็นสะพานไฟรับกระแสไฟฟ้าจากภายนอกเครื่องเก่าใช้งานมานาน ระบบควบคุมความเร็วผิดปกติ ฟิวส์คอยล์ลัดวงจร ขาดการบำรุงรักษา สายไฟชำรุดแตกกร้าว ทำให้กำลังไฟฟ้า/กระแสไฟฟ้าที่จ่ายเข้าเครื่องไม่คงที่ บางแห่งมีการจัดวางในสถานที่ที่ไม่เหมาะสม ไม่นั่นคง และไม่ปลอดภัย ซึ่งทำให้มอเตอร์เสียสมดุล หรืออาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ นอกจากนี้เครื่องที่พบปัญหาทั้งสอง Parameter น่าจะมาจากหลายสาเหตุร่วมกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพบว่าเครื่องมีปัญหาจากการสอบเทียบไม่ผ่านตามมาตรฐานเครื่องมือแพทย์ ต้องวิเคราะห์หาสาเหตุโดยช่างด้านเทคนิคเฉพาะต่อไป

จากผลการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit Centrifuge ในครั้งนี้ทำให้ผู้รับผิดชอบการตรวจทางห้องปฏิบัติการหน่วยบริการปฐมภูมิ มีความรู้ ความเข้าใจ ตระหนักถึงความสำคัญของการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ที่จำเป็น ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบการหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) ทำให้ค่าที่ได้มีความผิดพลาด ซึ่งอาจจะทำให้การวินิจฉัยภาวะการดำเนินของโรคต่างๆ คลาดเคลื่อน เช่น ภาวะซีด เป็นต้น

จากผลการดำเนินงานในครั้งนี ทำให้ผู้ปฏิบัติงานของหน่วยบริการปฐมภูมิและโรงพยาบาลแม่เครือข่ายระดับอำเภอซึ่งเป็นพี่เลี้ยง ตระหนักถึงการตรวจสอบประสิทธิภาพ การสอบเทียบเครื่องมือชนิดอื่นๆ ที่มีการนำมาใช้กับผู้ป่วย เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานมีความเชื่อมั่นในผลการทดสอบ ถึงแม้ว่าจะพบปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ในการดำเนินโครงการ อาทิ ระยะทางไกลในการเดินทาง โครงสร้างระบบไฟฟ้าของหน่วยบริการปฐมภูมิซึ่งไม่มีระบบสายดิน สถานที่ห้องปฏิบัติการบางแห่งมีการจัดวางไม่เหมาะสม ความหลากหลายของเครื่องหมุนเหวี่ยง และงบประมาณ เป็นต้น ทางกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ได้จัดทำโครงการต่อยอดเพื่อขยายผลการพัฒนาระบบคุณภาพหน่วยบริการปฐมภูมิโดยได้จัดทำโครงการถ่ายทอดความรู้และวิธีการในการดูแลรักษา และสอบเทียบเครื่องหมุนเหวี่ยงให้กับเครือข่ายในเขตสุขภาพที่ 2 ในวันที่ 20 มกราคม 2558 เพื่อสนับสนุนวิชาการและมีการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ให้กับเครือข่าย และให้เกิดการพัฒนาระบบคุณภาพอย่างยั่งยืน โดยมีเป้าหมายให้พี่เลี้ยงจากห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลแม่เครือข่ายระดับอำเภอสามารถพึ่งพาตนเองและดูแลเครือข่ายระดับปฐมภูมิได้ เป็นการสนองนโยบายกระทรวงสาธารณสุขในการใช้ทรัพยากรร่วมกัน นอกจากนี้ผู้ที่เกี่ยวข้องสามารถนำข้อมูลจากการดำเนินงานในครั้งนี ไปใช้วางแผนในการบริหารจัดการเครื่องมือ และระบบบริการ เพื่อให้เกิดการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานอย่างต่อเนื่อง

สรุป

จากผลการดำเนินงานโครงการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ของหน่วยบริการปฐมภูมิในจังหวัดพิษณุโลก ในเขตสุขภาพ 2 ประจำปีงบประมาณ 2557 ทำให้เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด Microhematocrit centrifuge ที่ใช้ทดสอบหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) ของหน่วยบริการปฐมภูมิในจังหวัดพิษณุโลกได้รับการสอบเทียบทุกเครื่อง และผู้รับผิดชอบห้องปฏิบัติการของหน่วยบริการปฐมภูมิ และโรงพยาบาลแม่เครือข่ายระดับอำเภอซึ่งเป็นพี่เลี้ยง มีความรู้ ความเข้าใจ การใช้งานตามหลักวิชาการมาตรฐานเครื่องมือแพทย์ และตระหนักถึงความสำคัญในการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ที่จำเป็นอันอาจส่งผลกระทบต่อผลการรวมทั้งนำผลจากการประเมินในครั้งนีมากำหนดแนวทางในการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในเขตสุขภาพที่ 2 เพื่อให้เกิดการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่อง และประชาชนได้รับบริการที่ถูกต้อง มีคุณภาพ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่เครือข่ายห้องปฏิบัติการระดับอำเภอ และเจ้าหน้าที่จากหน่วยบริการปฐมภูมิ ศูนย์สุขภาพชุมชนเมืองทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ระบบคุณภาพและมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุข สำหรับหน่วยบริการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) และศูนย์สุขภาพชุมชนเมือง (ศสม.) (MOPH-DMSc SPL01/2556). กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2556.

2. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการตรวจทางห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) ด้านงานเทคนิคการแพทย์ (MOPH-DMSc PL02/2555). พิมพ์ครั้งที่ 2. นครราชสีมา : หจก.อินดี้อาร์ท; 2555.
3. กองวิศวกรรมการแพทย์ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ 3 รายการ. [ออนไลน์]. 2552; [สืบค้น 1 สิงหาคม 2558]; [68 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://medi.moph.go.th/km/calstd/kmcal52_3.pdf.
4. กองวิศวกรรมการแพทย์ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. ค่าความผิดพลาดที่ยอมรับได้สำหรับการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ในระดับปกติ. [ออนไลน์]. 2550; [สืบค้น 1 สิงหาคม 2558]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://medi.moph.go.th/education/ebooking/pdf/8802.pdf>.
5. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจประเมินแบบตรวจติดตามและประเมินผล (CHECK LIST) ระบบคุณภาพและมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุข สำหรับหน่วยบริการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) และศูนย์สุขภาพชุมชนเมือง (ศสม.) [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 8 สิงหาคม 2558]; [11 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/qa/webBLQS/userfiles/checklistpcu.pdf>.
6. ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์, บรรณาธิการ. เครื่องมือวิทยาศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น : คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2544.
7. ศรีสกุล แสงประเสริฐ. เอกสารการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการ การบำรุงรักษาเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ในเขตสุขภาพที่ 2. วันที่ 20 มกราคม 2558. พิษณุโลก; 2558.
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง Centrifuge ใน : เครื่องมือวิทยาศาสตร์ [ออนไลน์]. 2544; [สืบค้น 16 พฤษภาคม 2558]; [28 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://home.kku.ac.th/chuare/12/centrifuge.pdf>.
9. บัญชา ลีลานีการวรรณ, บรรณาธิการ. มาตรฐานการสอบเทียบเครื่องมือแพทย์ ตอนที่ 1. [ออนไลน์]. [สืบค้น 16 พฤษภาคม 2558]; [110 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://medi.moph.go.th/education/ebooking/pdf/7992.pdf>.

Performance Evaluation of Microhematocrit Centrifuge in the Primary Care Units in Phitsanulok Province

Dujdao Boonyod Noppadol Piamsiri Anothai Sritonchai and Natthaphat Ratanadachanakin
*Reginal Medical Sciences Center 2, Phitsanulok Deportmeht of Medical Sciences Amphoe Muang,
Phitsanulok 65000. Thailand*

ABSTRACT Packed red cell volume (Hematocrit) test is performed routinely in primary care units (PCU) by using microhematocrit centrifuge. According to Ministry of Public Health guideline for medical laboratory in primary care unit the performance of equipment is an important factor that could affect the test result. To ensure the quality of test, the Regional Medical Science Center 2; Phitsanulok, developed the project to evaluate the effectiveness of the microhematocrit centrifuge used in primary care units of Phitsanulok province during fiscal year 2014. One hundred and forty microhematocrit centrifuges from 120 primary care units were assessed for the round per minutes (rpm) and timer used. The results showed that 75.7% of the centrifuges passed the test criteria while 24.3% failed to meet the round speed criteria due to an old condition and deficiency of an equipment. Consequently, the performance of the microhematocrit centrifuge was inaccurate. Thus, operator of PCU regular calibration and maintenance should be planned to ensure the reliable test result.

Key words: Microhematocrit centrifuge, Hematocrit Corresponding author E-mail : dujdao.b@dmsc.mail.go.th

การพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สาร กลุ่มไดออกซิน สารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน ในนมผง โดย HRGC/HRMS

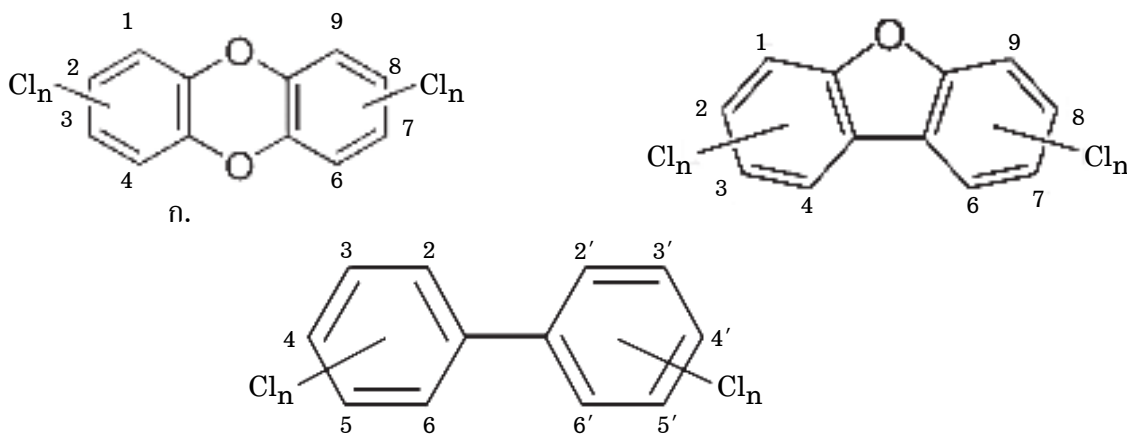
สุพัฒน์ แสงสวຍ ศิริชัย สัญญะ และสิรินธรนิชา สีมาชัยสิน

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ความเป็นพิษของสารกลุ่มไดออกซิน พีซีบีคล้ายไดออกซิน และพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน ในสัตว์ทดลองพบว่า ส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์และระบบภูมิคุ้มกัน มนุษย์ได้รับสารเข้าสู่ร่างกายจากการรับประทานอาหารมากกว่าร้อยละ 90 จนถึงปัจจุบันยังไม่มีกรรายงานการปนเปื้อนของสารกลุ่มดังกล่าวในอาหาร แต่ในต่างประเทศได้ให้ความสำคัญกับสารกลุ่มนี้มาก ซึ่งจัดเป็นสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน โดยเฉพาะอาหารที่ประชากรกลุ่มเสี่ยงบริโภค เช่น ทารกและเด็กซึ่งบริโภคนมในปริมาณสูง การวิเคราะห์สารกลุ่มเหล่านี้ใช้เวลา แรงงานและสารเคมีจำนวนมาก ผู้วิจัยได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ในนมผง โดยเพิ่มปริมาณตัวอย่างนมผงและปรับเปลี่ยนบางขั้นตอนในการสกัด ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ และขั้นตอนการแยกสารแต่ละกลุ่มออกจากกัน ซึ่งทำให้ได้วิธีที่ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์น้อยลงและใช้เวลาน้อยลงด้วย ค่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณของสารจำนวน 35 ตัว ในแต่ละกลุ่มที่กล่าวมาคือ 0.06-0.64, 1.85 และ 3.50 pg/g ไขมัน ตามลำดับ

บทนำ

สารกลุ่มไดออกซินเป็นชื่อที่นิยมเรียกกัน หมายถึงกลุ่มสาร 2 กลุ่ม ได้แก่ สารกลุ่มโพลีคลอรีเนตเตดไดเบนโซพาราไดออกซิน (polychlorinated dibenzo para dioxins; PCDDs) และสารกลุ่มโพลีคลอรีเนตเตดไดเบนโซฟูแรน (polychlorinated dibenzo furans; PCDFs) สารกลุ่มพีซีบีหมายถึงสารกลุ่มโพลีคลอรีเนตเตดไบฟีนิล (polychlorinated biphenyls; PCBs) แบ่งออกเป็นสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน (dioxin-like polychlorinated biphenyls; DL-PCBs) และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (non dioxin-like polychlorinated biphenyls; NDL-PCBs) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมี (ภาพที่ 1) สารทั้ง 4 กลุ่มมีจำนวน 75, 135, 12 และ 197 ตัว (congeners) ตามลำดับ รวมทั้งหมด 419 ตัว สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในอาหารเพื่อควบคุมให้เป็นไปตามกฎหมายของสหภาพยุโรป จะต้องตรวจในแต่ละกลุ่ม 7, 10, 12 และ 6 ตัว ตามลำดับ รวมจำนวน 35 ตัว⁽¹⁾



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมี ก. สารกลุ่มโพลีคลอรีเนตเตดไดเบนโซพาราไดออกซิน ข. สารกลุ่มโพลีคลอรีเนตเตดไดเบนโซฟูแรน และ ค. สารกลุ่มโพลีคลอรีเนตเตดไบฟีนิล (พีซีบี)

สารกลุ่มไดออกซิน (PCDDs/Fs) เกิดขึ้นจากการกระทำที่ไม่ได้ตั้งใจของมนุษย์ ตรงกันข้ามกับสารกลุ่มพีซีบี (PCBs = DL/NDL-PCBs) ซึ่งก่อนปี ค.ศ. 1985 ตั้งใจผลิตขึ้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม สารทั้งสองกลุ่มมีคุณสมบัติที่คงทน มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันเกิดขึ้นจากการกระทำที่ไม่ได้ตั้งใจของมนุษย์และปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ เช่น ปล่อย่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกำจัดแมลงและศัตรูพืช โรงงานผลิตเหล็กกล้า โรงงานปิโตรเคมี การสันดาปของเครื่องยนต์ ภูเขาไฟระเบิด ไฟป่า และการเผาขยะที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น สารเหล่านี้เมื่อเกิดขึ้นมาจะตกค้างและสะสมในสิ่งแวดล้อม ท้ายสุดก็เข้าสู่สิ่งมีชีวิตและส่งผลกระทบต่อสุขภาพ จากการศึกษาทางพิษวิทยาในสัตว์ทดลองพบว่า สารกลุ่มไดออกซินทำให้เกิดภาวะเยื่อโพรงมดลูกเจริญผิดที่ (endometriosis) เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลกระทบต่อการพัฒนาระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ พัฒนาการและสติปัญญา ในหญิงตั้งครรภ์ทำให้มีความผิดปกติของทารก⁽²⁾ แต่ยังไม่มียืนยันว่าสารกลุ่มไดออกซินทุกตัวก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคน แต่มีหลักฐานที่เชื่อถือได้ว่า สาร 2, 3, 7, 8 - TCDD เป็นสารที่ก่อมะเร็งในมนุษย์ปี ค.ศ. 1997 หน่วยงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) จัดให้ 2, 3, 7, 8 - TCDD เป็นสารที่รู้ว่าจะก่อให้เกิดมะเร็ง คลาส 1 (known human carcinogen) และเนื่องจากความเป็นพิษของสารกลุ่มไดออกซินและพีซีบีคล้ายไดออกซินแตกต่างกัน องค์การอนามัยโลก (WHO) ให้การยอมรับการเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารตัวอื่นๆ ในกลุ่มที่กล่าวมา กับ 2, 3, 7, 8 - TCDD โดยเรียกว่า แฟกเตอร์สมมูลความเป็นพิษ (Toxic Equivalency Factor, TEF)⁽¹⁾

ซึ่งสารแต่ละตัวมีค่า (ตารางที่ 1) ในส่วนความเป็นพิษของสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินมีลักษณะเฉพาะที่ต่างออกไป เช่น ในสัตว์ทดลองทำให้ตับขยายตัวผิดปกติและส่งเสริมให้เกิดเนื้องอกที่ตับ ส่งผลต่อการทำหน้าที่ของต่อมไร้ท่อ ยิ่งไปกว่านั้นบางตัวยังจัดว่าเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันและระบบประสาท (immunotoxin and neurotoxin) ส่วนในมนุษย์เป็นการยากที่จะระบุว่าการที่เกิขึ้นจากการได้รับสารกลุ่มพีซีบีมาจากสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินหรือสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน เนื่องจากโดยปกติสารกลุ่มเหล่านี้ผสมอยู่ด้วยกัน⁽³⁾

ตารางที่ 1 ค่า WHO-TEF 2005 ของสารกลุ่มไดออกซินและพีซีบีคล้ายไดออกซิน

ชื่อสารกลุ่มไดออกซิน	TEF value	ชื่อสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน	TEF value
2, 3, 7, 8 - TCDD	1		
1, 2, 3, 7, 8 - PeCDD	1	<i>non-ortho PCBs</i>	
1, 2, 3, 4, 7, 8 - HxCDD	0.1	PCB 77	0.0001
1, 2, 3, 6, 7, 8 - HxCDD	0.1	PCB 81	0.0003
1, 2, 3, 7, 8, 9 - HxCDD	0.1	PCB 126	0.1
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - HpCDD	0.01	PCB 169	0.03
OCDD	0.0003	<i>mono-ortho PCBs</i>	
2, 3, 7, 8 - TCDF	0.1	PCB 105	0.00003
1, 2, 3, 7, 8 - PeCDF	0.03	PCB 114	0.00003
2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF	0.3	PCB 118	0.00003
1, 2, 3, 4, 7, 8 - HxCDF	0.1	PCB 123	0.00003
1, 2, 3, 6, 7, 8 - HxCDF	0.1	PCB 156	0.00003
1, 2, 3, 7, 8, 9 - HxCDF	0.1	PCB 157	0.00003
2, 3, 4, 6, 7, 8 - HxCDF	0.1	PCB 167	0.00003
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - HpCDF	0.01	PCB 189	0.00003
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 - HpCDF	0.01		
OCDF	0.0003		

มนุษย์ได้รับสัมผัสสารกลุ่มนี้มากกว่า 90% จากการรับประทานอาหาร⁽⁴⁾ ในอดีตมีอุบัติการณ์การปนเปื้อนในอาหาร เช่น ปี ค.ศ. 1998 ประเทศเยอรมนีตรวจพบนมปนเปื้อนซึ่งมีสาเหตุจากอาหารสัตว์ปนเปื้อน⁽⁵⁾ ปี ค.ศ. 1999 ประเทศเบลเยียมเกิดวิกฤตการณ์ไดออกซินปนเปื้อนอาหารสัตว์ที่ส่งขายในทวีปยุโรปซึ่งส่งผลเสียหายมหาศาลต่อเศรษฐกิจ⁽⁶⁾ และปี ค.ศ. 2011 จากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำพบว่าในไข่มีการปนเปื้อนสารกลุ่มไดออกซินสูงกว่ากฎหมายกำหนด ซึ่งทำให้ฟาร์มเลี้ยงไก่ไข่จำนวน 4,700 ฟาร์ม ถูกปิด ไข่ถูกฆ่าหลายพันตัวและไข่ถูกทำลายหลายแสนฟอง⁽⁷⁾ เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์การปนเปื้อนสารกลุ่มไดออกซินและสารกลุ่มพีซีบีแบ่งเป็น 2 วิธี⁽⁸⁾ คือ 1) วิธีตรวจคัดกรอง (screening method) เป็นวิธีตรวจสอบเบื้องต้นที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายต่ำ เพื่อคัดกรองตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเกินระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ ซึ่งอาจเป็นวิธี bioassay หรือ GC/MS ข้อมูลที่ได้จากวิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและการประเมินการได้รับสารกลุ่มนี้เข้าสู่ร่างกาย และ 2) วิธีตรวจยืนยัน (confirmatory method) เป็นวิธีที่สามารถตรวจเชิงคุณภาพและปริมาณได้ ข้อมูลที่ได้จะทำให้รู้ว่าตัวอย่างปนเปื้อนสารแต่ละตัวในปริมาณเท่าไรและผลรวมของสารทุกตัวมีค่าเท่าไร ผลที่ได้สามารถนำไปยืนยันหรือมีผลทางกฎหมาย รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลเพื่อประเมินการได้รับสารกลุ่มนี้เข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับการกำหนดหรือ

ปรับค่าสูงสุดที่ยอมให้ปนเปื้อนได้ (maximum level, ML) ปัจจุบันสหภาพยุโรปกำหนดให้วิธีตรวจแบบยืนยันสารกลุ่มไดออกซินและสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินต้องใช้เครื่อง HRGC/HRMS หรือ GC-MS/MS และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินใช้เครื่อง GC-MS ที่สามารถตรวจเชิงปริมาณได้ถึงในระดับเฟมโตกรัม (upper femtogram, 10^{-15} g) ระดับพิโกกรัม (low picogram, 10^{-12} g) ระดับนาโนกรัม (nanogram, 10^{-9} g) มีความจำเพาะเจาะจงสูง และมีความถูกต้องสูง เป็นต้น ข้อด้อยของวิธีตรวจแบบยืนยันคือมีค่าใช้จ่ายสูงด้านเครื่องมือ สารเคมี แรงงานและความยุ่งยาก ทั้งสองวิธีประกอบด้วย 5 ขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่ 1) การชักตัวอย่างและการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน 2) การสกัด การระเหยและการหาปริมาณไขมัน 3) การกำจัดสารรบกวนหรือการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นและการระเหย รวมถึงการแยกสารออกเป็นกลุ่ม 4) การวัดด้วยเครื่องมือ และ 5) การคำนวณและรายงานผล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดตั้งห้องปฏิบัติการไดออกซินเป็นแห่งแรกของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551 โดยมีภารกิจหลักด้านการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในอาหารเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคของคนไทย ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในนมและผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมและทดสอบความใช้ได้ก่อนจึงจะนำไปสู่การสำรวจการปนเปื้อนสารกลุ่มนี้ในระดับชาติต่อไป จากที่กล่าวมานำเข้าสู่เป้าหมายของงานวิจัยนี้คือ เพื่อการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซินจำนวน 17 ตัว พีซีบีคล้ายไดออกซินจำนวน 12 ตัว และพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินจำนวน 6 ตัว (พีซีบีซบ่ง, marker PCBs หรือ indicator PCBs) ในอาหารนมผงด้วย HRGC/HRMS

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐาน และการเตรียม

- สารมาตรฐานกลุ่มไดออกซินเข้มข้น (EPA-1613CVS, US. EPA Method 1613 Calibration and Verification Solution, Wellington laboratories) ก่อนใช้เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 40 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานกลุ่มไดออกซินเจือจาง 5 ระดับ (Working Standard Calibration Solution; CS1dil-CS5dil) ซึ่งช่วงปริมาณของสารแต่ละตัวในสารละลายมาตรฐานปริมาตร 2 ไมโครลิตร แสดงไว้ในหัวข้อการทดสอบความเป็นเส้นตรงในผลการทดลอง
- สารมาตรฐานกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินเข้มข้น (WP-CVS, WHO/EPA PCB Calibration Solutions for HRGC/HRMS, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินเจือจางชั้นกลาง 5 ระดับ (Intermediate Standard Calibration Solution, WPCS4I-WPCS5I)
- สารละลายมาตรฐานกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินเข้มข้น (P48-M-CVS BS EN 1948-4:2010, HRGC/HRMS Calibration Solutions for the marker PCBs, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินเจือจางชั้นกลาง 5 ระดับ (Intermediate Standard Calibration Solution, MCS1I-MCS5I)
- การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่มพีซีบีคล้ายและไม่คล้ายไดออกซินเจือจาง 5 ระดับ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Working Standard Calibration Solution, DL/NDL-PCBdil1-5) โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกลุ่ม DL-PCBs เจือจางชั้นกลาง DL-PCBs CS1I, CS2I, CS3I, CS4I, CS5I ผสมกับสารละลายมาตรฐานกลุ่ม NDL-PCBs เจือจางชั้นกลาง NDL-PCBs CS1I, CS2I, CS3I, CS4I, CS5I ตามลำดับในอัตราส่วน 1:1 และเติมโนเนนอีก 1 ส่วน ซึ่งช่วงปริมาณของสารแต่ละตัวในสารละลายมาตรฐานปริมาตร 2 ไมโครลิตร แสดงไว้ในหัวข้อการทดสอบความเป็นเส้นตรงในผลการทดลอง

- สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native PCDDs/Fs เข้มข้น (EPA-1613PAR, US EPA Method 1613B Native PCDD/PCDF Solution/Mixture, Wellington laboratories) ก่อนใช้เจือจางด้วยอะซิโตน เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native PCDDs/Fs เจือจาง ซึ่งประกอบด้วยสาร native TCDD/F, native OCDD/F และอีก 13 ตัวที่เหลือมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.008, 0.08 และ 0.04 pg/μl ตามลำดับ
- สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native DL-PCBs เข้มข้น (WP-STK, Native PCB Solution WHO/EPA PCBs, Stock Standard, Wellington laboratories) ก่อนใช้เจือจางด้วยอะซิโตน เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native DL-PCBs เจือจาง ซึ่งสารแต่ละตัวของ native DL-PCBs (12 ตัว) มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.448 pg/μl
- สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/Fs เข้มข้น (EPA-1613ISS, Internal Standard Spiking Solution, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 40 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานไอโซโทป $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/Fs เจือจาง ซึ่งประกอบด้วย $^{13}\text{C}_{12}$ -1, 2, 3, 4-TCDD และ $^{13}\text{C}_{12}$ -1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD ทั้งสองตัวมีความเข้มข้นแต่ละ 2.5 pg/μl
- สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs เข้มข้น (WP-ISS, $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB internal Standard Solution WHO/EPA PCBs, Stock Syringe Standard, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 200 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs เจือจางซึ่งประกอบด้วย PCB 70L, PCB 111L, PCB 138L และ PCB 170L ทั้งสี่ตัวมีความเข้มข้นแต่ละ 5 pg/μl
- สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/DFs เข้มข้น (EPA-1613LCS, Labeled compound Stock solution, Wellington laboratories), สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -DL-PCBs เข้มข้น (WP-LCS, “Dioxin-Like” PCBs $^{13}\text{C}_{12}$ -Surrogate Spiking Solution, Wellington laboratories) และสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -NDL-PCBs เข้มข้น (P48-M-ES, BS EN 1948-4:2010, Mass-labeled Marker PCB extraction standard, Wellington laboratories) เจือจางและผสมให้เป็นเนื้อเดียวแล้วแบ่งเก็บใส่ GC vial สำหรับทำเป็น Clean-up Standard หรือ Extraction Standard ซึ่งแต่ละขวดจะมีสารจำนวน 35 ตัว ประกอบด้วยสารไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/Fs ทุกตัวจะมีเนื้อสารปริมาณ 50 พิโกกรัม/ขวด ยกเว้น $^{13}\text{C}_{12}$ -OCDD จะมี 100 พิโกกรัม/ขวด และสารไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -DL-PCBs/NDL-PCBs ทุกตัวมีเนื้อสารปริมาณ 100 พิโกกรัม/ขวด

สารเคมี ได้แก่ เมทานอล ไดคลอโรมีเทนและอะซิโตน (Pesticide grade, Labscan) เฮกเซน (n-Hexane 95%, Residue & Pesticide grade, Fisher Scientific) ไดเอทิลอีเทอร์ (Pesticide grade, Fisher Scientific) เอทานอล (Absolute AR grade, Merck) โนเนน (nonane, GC grade, Sigma) โปแตสเซียมออกซาลेट (ACS, Merck) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (AR grade, J.T.Baker) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (AR grade, Merck) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Ultra-resi analyses, J.T.Baker) ซิลิกาเจล (Silica gel 60 for column chromatography, Merck) ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก (30% H_2SO_4 - SiO_2) ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก (40% H_2SO_4 - SiO_2) โพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์-ซิลิกา (KOH-SiO_2) และเบลีก-อะลูมิเนียมออกไซด์ (Alumina B-Super I for Dioxin Analysis, MP Biomedical) สารเคมีทุกชนิดที่กล่าวมาก่อนใช้ต้องเตรียมตามคำแนะนำของเอกสารอ้างอิง^(9, 10, 11)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง High Resolution Gas Chromatograph/High Resolution Mass Spectrometer, (HRGC/HRMS, Agilent, GC7890A/Waters, Auto Spec Premier) GC capillary Columns (BPX-DXN 60 m × ID

0.25 mm, SGE และ HT8 60 m × ID 0.25 mm, SGE) เครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum rotary evaporator, Buchi, R-215) เครื่องเขย่าแบบหมุนสาย (Shaker orbital, IKA, KS 501 digital) และเครื่องระเหยแบบหลายหลอดแก้ว (Multiple tube evaporator, Zymark, Turbo Vap LV)

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดวัดปริมาตรความจุ 2, 25, 50 มิลลิลิตร ขวดแก้วรูปชมพู่ความจุ 250 มิลลิลิตร กรวยแยกความจุ 500 และ 1,000 มิลลิลิตร คอลัมน์แก้วเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 มิลลิเมตร และ 10 มิลลิเมตร หลอดแก้วกันแคบความจุ 30 มิลลิลิตร ใบแก้ว GC vials ความจุ 1.2 มิลลิลิตร Glass insert with spring ความจุ 300 ไมโครลิตร

ตัวอย่าง

ใช้นมผงดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็กอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 3 ปี เป็นตัวอย่างสำหรับการพัฒนาวิธี

การพัฒนาวิธี

ในการตรวจวัดสารเคมีเชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (instrumental chemical analysis) หลังจากจัดหา ติดตั้ง ปรับเครื่องมือให้พร้อมสำหรับใช้งาน และสร้างโปรแกรมสำหรับตรวจติดตามสารที่สนใจ จะต้องทดลองฉีดสารมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่เครื่องสามารถวัดปริมาณได้ถูกต้อง หรือถ้าสารที่สนใจไม่มีข้อกำหนดในกฎหมายให้วิธีวิเคราะห์ต้องสามารถหาปริมาณน้อยที่สุดตามที่กำหนด ก็สามารถเริ่มจากจุดนี้ได้

สารกลุ่มไดออกซิน กลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน และกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินเป็นสารที่ไม่มีขั้วและละลายได้ดีในไขมัน ระดับปนเปื้อนสูงสุดที่อนุญาตของสหภาพยุโรป (EU commission regulation No 1259/2011)⁽¹⁾ กำหนดไว้ต่ำมากและคำนวณต่อปริมาณไขมัน 1 กรัม นั่นคือ 2.5 pg TEQ/g fat, 5.5 pg TEQ/g fat และ 40 ng/g fat ตามลำดับ และกำหนดให้ใช้เทคนิค Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) ในการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งปัจจัยที่สำคัญของเทคนิคนี้คือต้องหาปริมาณสารไอโซโทปที่เหมาะสมที่ต้องเติมในตัวอย่างและปริมาณตัวอย่าง

การสกัด

ซึ่งตัวอย่างนมผงปริมาณ 35.0 กรัม และโปแตสเซียมออกซาลेटปริมาณ 1.5 กรัม เติมน้ำละลายมาตรฐานไอโซโทปผสมของสารกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/DFs, กลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -DL-PCBs และกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -NDL-PCBs เจือจาง 1 ขวด เติมน้ำอุ่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทใส่กรวยแยกขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำมันอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำละลายผสมเฮกเซน/ไดเอทิลอีเทอร์ (3:1) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น (เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาทีไม่แยกชั้น ให้เติมน้ำมันอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ และปล่อยให้แยกชั้น) เทสารละลายชั้นบนลงในขวดกันกลขนาด 1,000 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยสารละลายผสมเฮกเซน/ไดเอทิลอีเทอร์ (3:1) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บสารละลายชั้นบนรวมกันไว้ กำจัดน้ำออกจากสารสกัดด้วยการกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศให้เหลือปริมาตรประมาณ 35 - 40 มิลลิลิตร เทใส่กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

การหาปริมาณไขมัน

ปิเปตสารสกัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วสะอาดและแห้งที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว ระเหยตัวทำละลายให้หมดไปและชั่งน้ำหนักหาปริมาณไขมัน

การกำจัดไขมันด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

เทสารสกัดที่ได้ทั้งหมดใส่ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมหะกษณปริมาตร 160 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เปิดฝากรวยแยกและเขย่าด้วยการหมุนด้วยมือจนไม่เกิดปฏิกิริยา ปล่อยให้แยกชั้น ทั้งชั้นกรด (ชั้นล่าง) และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือก่อนนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 15 นาที ปล่อยให้แยกชั้น ทั้งชั้นกรด (ชั้นล่าง) ชั้นบนเติมน้ำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 (m/v) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่า ปล่อยให้แยกชั้นและทั้งชั้นล่าง ชั้นบนเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปล่อยให้แยกชั้นและทั้งชั้นล่าง สารสกัดชั้นบนปล่อยให้ไหลผ่านโซเดียมซัลเฟตและนำไปประเหยให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร

การทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย Multi-layer silica column

ซึ่งซิลิกา โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์-ซิลิกา ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 30 ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 40 ซิลิกาและโซเดียมซัลเฟต ปริมาณ 1.0, 3.0, 0.5, 4.0, 2.0, 0.5 และ 3.0 กรัม ตามลำดับ ใส่ลงในคอลัมน์แก้วเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 มิลลิเมตร ที่อุดปลายด้วยใยแก้วเคาะให้ช่องแข็งดูดซับเรียงตัวเป็นระเบียบผ่านะกษณปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ระวังอย่าให้คอลัมน์แห้ง) เมื่อระดับะกษณอยู่ที่ชั้นโซเดียมซัลเฟตใส่สารสกัดที่ได้จากขั้นตอนที่ผ่านมา ะด้วยะกษณปริมาตร 60 มิลลิลิตร รองรับสารสกัดด้วยขวดกันกลขนาด 100 มิลลิลิตร ในสารสกัดนี้ประกอบด้วย สารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ปล่อยให้ะกษณไหลจนหยดสุดท้ายแล้วนำไปประเหยให้เหลือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร

การแยกสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs (Fractionation)

ซึ่งซิลิกา เบสิก-อะลูมิเนียมออกไซด์-ซิลิกา ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 40 ซิลิกา และโซเดียมซัลเฟต ปริมาณ 0.3, 1.8, 0.2, 0.6, 0.2 และ 1.0 กรัมตามลำดับ ใส่ลงในคอลัมน์แก้วเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 10 มิลลิเมตร ที่อุดปลายด้วยใยแก้วเคาะให้ช่องแข็งดูดซับเรียงตัวเป็นระเบียบ ผ่านะกษณปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ระวังอย่าให้คอลัมน์แห้ง) ใส่สารสกัดที่ได้จากขั้นตอนที่ผ่านมา ะด้วยะกษณปริมาตร 5 มิลลิลิตร รองรับสารด้วยหลอดแก้วความจุ 30 มิลลิลิตร ระบุเป็นหลอดที่ 1 (fraction 1) ะด้วยะกษณ/ไดคลอโรมีเทน (49:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร รองรับสารด้วยหลอดแก้วความจุ 30 มิลลิลิตร ระบุเป็นหลอดที่ 2 (fraction 2) และสุดท้ายะด้วยะกษณ/ไดคลอโรมีเทน (1:1) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร รองรับสารด้วยหลอดแก้วความจุ 30 มิลลิลิตร ระบุเป็นหลอดที่ 3 (fraction 3) ะเหยตัวทำละลายทั้งสามหลอดด้วยเครื่องระเหยแบบหลายหลอดให้เหลือประมาณ 100 ไมโครลิตร และปิเปิดแต่ละหลอดใส่ใน Glass insert with spring ความจุ 300 ไมโครลิตร ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยไปจนหมด เติมน้ำมันสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs เจือจาง และสารละลายมาตรฐานไอโซโทป $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/Fs เจือจาง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Glass insert with spring ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 วินาที ท้ายสุดของขั้นตอนนี้ปิเปิดทั้ง 3 ส่วน ส่วนละ 5 ไมโครลิตร ผสมกันใส่ Glass insert with spring ใหม่ระบุเป็น vial ที่ 4 และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 วินาที (สรุปตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง ต้องได้สารสกัดใน Glass insert with spring จำนวน 4 vial)

การวัดปริมาณสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ด้วยเครื่อง HRGC/HRMS

ก่อนการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องต้องปรับพารามิเตอร์ต่างๆ (instrument tuning) ในส่วนของ HRMS ให้มีค่าการแยก (resolution at 10% valley) ให้เหมาะสมในการวิเคราะห์สารในแต่ละกลุ่ม นั่นคือค่าการแยกของการวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs ต้องไม่น้อยกว่า 10,000⁽⁹⁾ และค่าการแยกของการวิเคราะห์สารกลุ่ม DL-PCBs

และ NDL-PCBs ต้องไม่น้อยกว่า 8,000⁽¹⁰⁾ ตลอดระยะเวลาในการฉีดตัวอย่าง หลังการปรับแล้วต้องสอบเทียบเครื่อง (instrument calibration) ด้วยสารมาตรฐาน เปอร์ฟลูออโรคีโรซีน (perfluorokerosene, PFK) ให้ผ่านโดยการแยกต้องได้ตามที่กล่าวมา

ตั้งสภาวะของเครื่อง HRGC/HRMS เพื่อการวิเคราะห์สารทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 2) และการวัดเริ่มต้นด้วยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำสุด แล้วตรวจดูพีคที่ได้ต้องครบทุกพีคและค่า signal/noise ของแต่ละพีคต้องไม่น้อย 2.5 เมื่อผ่านตามเงื่อนไขจึงเริ่มฉีดสารมาตรฐานและสารสกัดตัวอย่าง กรณีวัดสารกลุ่มไดออกซินใช้สารสกัดตัวอย่างคือส่วนที่อยู่ใน Glass insert with spring ที่ 3 และกรณีวัดสารกลุ่มพีซีบีใช้สารสกัดที่ได้จากการผสมกันจากทั้งสามส่วนคือ Glass insert with spring ที่ 4

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะของเครื่อง HRGC/HRMS ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs และสารกลุ่ม DL/NDL-PCBs

หัวข้อ (subjects)	สภาวะ (conditions)	
	สารกลุ่ม PCDDs/Fs	สารกลุ่ม DL/NDL-PCBs
HRGC:		
Column	BPX-DXN, 60 m	HT8, 60 m
Injection mode	splitless	splitless
Injector temp (°C)	280	280
Oven temp program (°C)	initial temp. 150°C (hold 1 min), ramp 15°C/min to 210°C, ramp 3°C/min to 310°C, ramp 5°C/min to 320°C, ramp 10°C/min to 330°C (hold 7 min)	initial temp. 150°C (hold 1 min), ramp 20°C/min to 210°C, ramp 2°C/min to 250°C, ramp 10°C/min to 330°C, hold 22 10°C/min to 330°C (hold 7 min)
He flow (constant flow)(ml/min)	1.0	1.0
Injection volume (µl)	2	2
HRMS:		
Transfer line temp (°C)	250	250
Ion source temp (°C)	280	280
Ionization mode	EI+	EI+
Electron Energy (eV)	634	634
Trap (µA)	4.20	4.20
Scanning technique	VSIR (voltage single ion recording)	VSIR (voltage single ion recording)
Dwell time (ms)	Native compounds 100 ms, labeled	Native compounds 100 ms, labeled compounds 25 ms
VSIR1 (M, M+2 and lock mass) (RT range, min)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -TCDD/F and 330.9792 (18.00-22.50)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -PCB28, 52 and 292.9824 (14.00-19.00)
VSIR2 (M+2, M+4 and lock mass) (RT range, min)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -PeCDD/Fs and 342.9792 (22.50-26.50)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -PCB77, 81, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156 and 318.9792 (19.00-30.80)
VSIR3 (M, M+2, M+4 and lock mass) (RT range, min)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -HxCDDs/Fs and 380.9760 (26.50-31.00)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -PCB157, 167, 169, 180, 189 and 380.9760 (30.80-40.00)
VSIR4 (M, M+2, M+4 and lock mass) (RT range, min)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -HpCDDs/Fs and 416.9760 (31.00-35.50)	-
VSIR5 (M+2, M+4 and lock mass) (RT range, min)	¹² C ₁₂ , ¹³ C ₁₂ -OCDDs/Fs and 454.9728 (35.50-42.50)	-

การคำนวณ

การคำนวณแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเป็นการจัดการกับพีค สร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณปริมาณสารในตัวอย่างของเหลวสกัดด้วยโปรแกรม Masslynx™ v 4.1 และขั้นตอนที่สองเป็นการคำนวณหาปริมาณและสมมูลความเป็นพิษของสารแต่ละตัวในไขมันที่ได้จากตัวอย่าง รวมถึงคำนวณปริมาณผลรวมสมมูลความเป็นพิษของสารแต่ละกลุ่มโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2007

ผล

การพัฒนาวิธี

ผู้วิจัยและคณะลดปริมาณของสารมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/DFs สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -DL-PCBs และ สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -NDL-PCBs สำหรับทำเป็น Extraction Standard ที่เติมลงในตัวอย่างก่อนการสกัด ซึ่งจะทำให้ในสารสกัดบริสุทธิ์ของตัวอย่างก่อนการฉีดเข้าเครื่อง HRGC/HRMS มีความเข้มข้นสารมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/Fs ทุกตัวเท่ากับ 2.5 พิโกกรัม/ไมโครลิตร ยกเว้น $^{13}\text{C}_{12}$ -OCDD จะมี 5.0 พิโกกรัม/ไมโครลิตร และสารมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -DL-PCBs/NDL-PCBs ทุกตัวมีความเข้มข้นเท่ากับ 5.0 พิโกกรัม/ไมโครลิตร ดังนั้นจึงต้องเจือจางสารมาตรฐานสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานทั้ง 5 ระดับ เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่มดังกล่าวเท่ากับในสารละลายตัวอย่างสกัดบริสุทธิ์ และได้ทดสอบความเป็นเส้นตรง (ตารางที่ 3)

ต่อมาได้ปรับขั้นตอนการสกัด ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น และขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs (Fractionation) ซึ่งได้วิธีดังที่อธิบายไว้ในตอนต้น เพื่อยืนยันความถูกต้องและน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนานี้ ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีซึ่งได้ผลดังต่อไปนี้

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

ในงานวิจัยนี้การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารกลุ่มดังกล่าวใช้เทคนิคการเจือจางไอโซโทป (isotope dilution) ซึ่งสร้างกราฟมาตรฐานแบบ isotope dilution calibration (ยกเว้น 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, OCDF และ PCB 138) โดยหา Relative response factor (RRF) จากการทดสอบฉีดสารมาตรฐานปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทั้ง 5 ระดับตามที่กล่าวหว่าข้อสารมาตรฐานและการเตรียม พบว่าสารทุกตัวที่ต้องการวิเคราะห์มีค่า %CV อยู่ระหว่าง 2.04 - 12.32% และการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณสาร 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, OCDF และ PCB 138 ใช้วิธี internal standard ซึ่งสร้างกราฟมาตรฐานแบบ internal standard calibration พบว่าสารทั้ง 3 ตัวได้ค่า %CV อยู่ระหว่าง 4.34 - 7.71% ดังมีรายละเอียด (ตารางที่ 3)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างนมผงสำหรับทารก 7 ข้าง และใช้โปรแกรม Masslynx™ v 4.1 (TargetLynx) โดยตั้งค่าอัตโนมัติในการหา LOD และ LOQ แล้วนำมาคำนวณต่อโดยเพิ่มปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดตัวอย่างและปริมาณไขมันในตัวอย่าง (ตารางที่ 4) ซึ่งค่า LOQ ที่ได้มีความสำคัญมากและนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าปริมาณรวมความเป็นพิษของกลุ่มสาร สรุปค่า LOQ สำหรับสารกลุ่มไดออกซินมีค่า 0.06 - 0.32 pg/g fat ยกเว้น OCDD/F ยังต้องพิสูจน์อีกครั้ง และค่า LOQ สำหรับสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินและพีซีบีซึ่งมีค่า 1.85 และ 3.50 pg/g fat ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของสารแต่ละตัวในสารกลุ่ม PCDDs/Fs และสารกลุ่ม DL/NDL-PCBs

ปริมาณสารมาตรฐานและความเป็นเส้นตรง					
ชื่อสาร	ปริมาณ ต่ำสุด-สูงสุด (pg)	%CV or %RSD	ชื่อสาร	ปริมาณ ต่ำสุด-สูงสุด (pg)	%CV or %RSD
2, 3, 7, 8-TCDD	0.10 – 10.0	8.85	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.50 – 25.0	5.04
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.50 – 25.0	6.14	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.50 – 25.0	2.76
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.50 – 25.0	3.61	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.50 – 25.0	5.06
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.50 – 25.0	3.03	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.50 – 25.0	4.72
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.50 – 25.0	4.34	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.50 – 25.0	7.21
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.50 – 25.0	2.04	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.50 – 25.0	7.69
OCDD	1.00 – 100.0	9.18	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.50 – 25.0	9.52
2, 3, 7, 8-TCDF	0.10 – 0.0	11.45	OCDF	1.00 – 100.0	7.71
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.50 – 25.0	7.88			
PCB 77	0.67 – 53.33	5.89	PCB 157	0.67 – 53.33	12.32
PCB 81	0.67 – 53.33	6.49	PCB 167	0.67 – 53.33	6.95
PCB 126	0.67 – 53.33	4.37	PCB 189	0.67 – 53.33	7.01
PCB 169	0.67 – 53.33	6.73	PCB 28	0.33 – 166.67	7.30
PCB 105	0.67 – 53.33	6.78	PCB 52	0.33 – 166.67	7.88
PCB 114	0.67 – 53.33	7.18	PCB 101	0.33 – 166.67	7.15
PCB 118	0.67 – 53.33	4.94	PCB 138	0.33 – 166.67	5.14
PCB 123	0.67 – 53.33	6.30	PCB 153	0.33 – 166.67	3.79
PCB 156	0.67 – 53.33	7.41	PCB 180	0.33 – 166.67	3.34

ตารางที่ 4 ค่า LOD และ LOQ ของสารแต่ละตัวในสารกลุ่ม PCDDs/Fs และสารกลุ่ม DL/NDL-PCBs

ชื่อสาร	LOD (pg/g)	LOQ			ชื่อสาร	LOD (pg/g)	LOQ		
		(pg/g)	SD	%R*			(pg/g)	SD	%R*
2, 3, 7, 8-TCDD	0.05	0.06	0.02	121.4	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.05	0.32	0.06	108.9
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.05	0.32	0.06	94.4	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.05	0.32	0.08	106.4
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.07	0.32	0.06	89.4	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.05	0.32	0.06	102.3
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.07	0.32	0.10	104.7	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.08	0.32	0.05	94.9
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.07	0.32	0.17	74.7	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.07	0.32	0.11	83.6
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.06	0.32	0.08	127.7	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.06	0.32	0.08	113.6
OCDD	1.33	0.64	0.65	211.1	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.08	0.32	0.09	131.1
2, 3, 7, 8-TCDF	0.04	0.06	0.02	75.7	OCDF	1.47	0.64	0.70	271.6
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.05	0.32	0.05	132.0					
LOQ มีผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat) : lower bound						0.732	0.14	100.3	
LOQ มีผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat) : medium bound						0.732	0.14	100.3	
LOQ มีผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat) : upper bound						0.732	0.14	100.3	
PCB 77	0.35	1.85	0.48	103.2	PCB 118	0.28	1.85	1.29	105.4
PCB 81	0.38	1.85	0.38	89.3	PCB 123	0.32	1.85	0.68	88.9
PCB 126	0.56	1.85	0.85	98.2	PCB 156	0.72	1.85	1.16	104.6
PCB 169	0.34	1.85	0.94	99.4	PCB 157	0.26	1.85	2.99	397.4
PCB 105	0.35	1.85	0.80	116.1	PCB 167	0.22	1.85	1.04	98.1
PCB 114	0.30	1.85	0.45	90.4	PCB 189	1.66	1.85	0.71	111.2
LOQ มีผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat) : lower bound						0.671	0.10	98.5	
LOQ มีผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat) : medium bound						0.671	0.10	98.5	
LOQ มีผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat) : upper bound						0.671	0.10	98.5	
LOQ มีผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat : lower bound						1.396	0.21	99.2	
LOQ มีผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat : medium bound						1.396	0.21	99.2	
LOQ มีผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat : upper bound						1.396	0.21	99.2	
PCB 28	0.96	3.50	0.14	73.4	PCB 138	0.33	3.50	0.13	121.1
PCB 52	0.83	3.50	0.14	116.6	PCB 153	0.30	3.50	0.11	100.1
PCB 101	0.61	3.50	0.10	95.1	PCB 180	0.86	3.50	0.16	114.8
LOQ มีผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat) : lower bound						24.5	0.70	115.2	
LOQ มีผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat) : medium bound						24.5	0.70	115.2	
LOQ มีผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat) : upper bound						24.5	0.70	115.2	

* %R: ร้อยละการกลับคืน (%recovery)

ความแม่นยำและความเที่ยง

จากการทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานกลุ่มดังกล่าวลงในตัวอย่างนมผงที่ระดับ LOQ (ตารางที่ 4) ระดับสูงสุดที่ยอมให้ตรวจพบได้ (ตารางที่ 5) การวิเคราะห์ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิงนมผงของสารกลุ่มไดออกซินทุกตัวที่มีค่ามากกว่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณได้ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 87.9 - 120.6 (ตารางที่ 6) และได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการกับ Bipea ประเทศฝรั่งเศสในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม NDL-PCBs ในตัวอย่างนมผง พบว่าความเที่ยงแสดงในค่า Z-score อยู่ในช่วง -1.60 ถึง +1.35 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 5 ความแม่นยำและความเที่ยงของการเติมสารมาตรฐานกลุ่ม PCDDs/Fs และ PCBs ที่ระดับ ML

ชื่อสาร	spiked level (pg/g)	n = 6		ชื่อสาร	spiked level (pg/g)	n = 6	
		%R mean ± SD	%RSD			%R mean ± SD	%RSD
2, 3, 7, 8-TCDD	0.20	121.4 ± 8.7	8.37	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.98	104.3 ± 8.4	5.48
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.98	108.4 ± 6.3	7.06	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.98	104.6 ± 3.6	6.27
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.98	108.6 ± 5.8	6.67	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.98	102.1 ± 5.3	4.90
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.98	109.3 ± 7.2	8.54	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.98	104.1 ± 6.1	6.43
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.98	101.3 ± 11.4	13.35	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.98	103.6 ± 4.6	5.29
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - HpCDD	0.98	107.9 ± 7.3	6.95	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.98	109.3 ± 4.7	6.43
OCDD	1.96	200.2 ± 16.3	9.97	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.98	101.8 ± 3.0	5.29
2, 3, 7, 8-TCDF	0.20	112.1 ± 10.9	8.57	OCDF	1.96	228.8 ± 56.4	24.41
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.98	108.6 ± 4.2	4.53				
ผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat): lower bound					2.420	108.0 ± 5.2	6.77
ผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat): medium bound					2.420	108.0 ± 5.2	6.77
ผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat): upper bound					2.420	108.0 ± 5.2	6.77
PCB 77	22.03	104.9 ± 5.3	5.96	PCB 118	22.03	124.1 ± 5.2	6.20
PCB 81	22.03	104.6 ± 4.9	5.63	PCB 123	22.03	112.3 ± 2.5	3.33
PCB 126	22.03	114.0 ± 8.2	7.08	PCB 156	22.03	114.5 ± 4.5	3.82
PCB 169	22.03	98.3 ± 6.0	5.28	PCB 157	22.03	154.9 ± 4.6	4.34
PCB 105	22.03	132.8 ± 3.5	5.10	PCB 167	22.03	109.1 ± 3.4	3.37
PCB 114	22.03	117.5 ± 4.3	5.14	PCB 189	22.03	107.4 ± 3.0	4.14
ผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat): lower bound					3.175	110.4 ± 6.5	5.60
ผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat): medium bound					3.175	110.4 ± 6.5	5.60
ผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat): upper bound					3.175	110.4 ± 6.5	5.60
ผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat: lower bound					5.595	109.3 ± 4.9	5.02
ผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat: medium bound					5.595	109.3 ± 4.9	5.02
ผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat: upper bound					5.595	109.3 ± 4.9	5.02
PCB 28	0.61	101.11 ± 0.7	10.58	PCB 138	0.61	100.5 ± 5.1	6.54
PCB 52	0.61	119.6 ± 10.0	9.00	PCB 153	0.61	103.6 ± 4.8	4.89
PCB 101	0.61	119.9 ± 6.0	6.06	PCB 180	0.61	161.3 ± 26.0	17.98
ผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat): lower bound					42.30	115.2 ± 3.7	3.54
ผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat): medium bound					42.30	115.2 ± 3.7	3.54
ผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat): upper bound					42.30	115.2 ± 3.7	3.54

* %R: ร้อยละการกลับคืน (%recovery)

ตารางที่ 6 ความเที่ยงของสารแต่ละตัวในสารกลุ่ม PCDDs/Fs ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างวัสดุ อ้างอิงนมผง (Reference material No 607 Natural spray-dried milk powder)

ชื่อสาร	certified value (pg/g fat)	ปริมาณจากการวิเคราะห์ (pg/g fat)		
		ครั้งที่ 1 (%Recovery)	ครั้งที่ 2 (%Recovery)	ครั้งที่ 3 (%Recovery)
2,3,7,8-TCDD	0.25	0.24 (96.0)	0.26 (104.0)	0.26 (104.0)
2,3,7,8-TCDF	0.05	0.035 (70.0)	0.045 (90.0)	0.045 (90.0)
1,2,3,7,8-PeCDD	0.79	0.91 (115.2)	0.80 (101.3)	0.84 (106.3)
1,2,3,7,8-PeCDF	0.054	0.06 (111.1)	0.04 (74.1)	0.04 (74.1)
2,3,4,7,8-PeCDF	1.81	1.77 (97.8)	1.79 (98.9)	1.83 (101.1)
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.42	0.39 (92.9)	0.38 (90.5)	0.39 (92.9)
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.98	0.97 (99.0)	0.97 (99.0)	0.88 (89.8)
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.34	0.39 (114.7)	0.37 (108.8)	0.41 (120.6)
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.94	0.98 (104.3)	0.90 (95.7)	1.01 (107.4)
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1.01	1.07 (109.9)	1.15 (113.9)	0.98 (97.0)
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.07	1.12 (104.7)	1.07 (100.0)	0.94 (87.9)

ตารางที่ 7 ความเที่ยงของสารกลุ่ม NDL-PCBs ในตัวอย่างนมผง จากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการกับ Bipea ประเทศฝรั่งเศส

ชื่อสารกลุ่ม NDL-PCBs	Assigned value (pg/g fat)	ปริมาณจากการวิเคราะห์ (pg/g fat)	ค่า Z-score	เกณฑ์การยอมรับ Z-score $\pm$ 2
PCB 28	0.80	0.40	-1.60	satisfied
PCB 52	0.80	0.60	-0.80	satisfied
PCB 101	3.5	3.0	-0.48	satisfied
PCB 138	1.6	2.1	1.00	satisfied
PCB 153	4.1	2.7	-1.12	satisfied
PCB 180	5.7	8.0	1.35	satisfied
sum of the NDL-PCBs	16.2	16.9	0.14	satisfied

วิจารณ์

ดังที่กล่าวมาแล้วการวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซินและกลุ่มพีซีบีประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ผู้วิจัยและคณะได้พัฒนาและปรับขั้นตอนต่างๆ คือ

1) ลดความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDDs/Fs ซึ่งเป็น Extraction Standard และ Internal Standard Spiking Solution เป็น 2.5 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งน้อยกว่าวิธีของ US-EPA 1613 revision B⁽⁹⁾ และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการเคมีสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยอุเมียว (Umeå university) ประเทศสวีเดนเมื่อปี พ.ศ. 2553 และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการบริษัท IDEA Consultants, Inc. จังหวัดชิซุโอกะ (Shizuoka) ประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2554 และงานวิจัยของ Joseph Ferrario และคณะ⁽¹²⁾ ซึ่งใช้ในช่วง 5-100 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อให้เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในนมผงซึ่งต้องวิเคราะห์ในระดับส่วนในล้านล้านส่วน (part per trillion, ppt)

2) ลดความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -DL-PCBs และกลุ่ม $^{13}\text{C}_{12}$ -NDL-PCBs เป็น 5 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งน้อยกว่าวิธีของ US-EPA 1668 revision B⁽¹⁰⁾ และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการเคมีสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยอูเมียว (Umeå university) ประเทศสวีเดนเมื่อปี พ.ศ. 2553 และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการบริษัท IDEA Consultants, Inc. จังหวัดชิซุโอกะ (Shizuoka) ประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2554 ซึ่งใช้ในช่วง 5-500 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร เหตุผลในการกระทำนี้ เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อที่ผ่านมา

3) เพิ่มปริมาณตัวอย่างนมผงในการสกัดสารกลุ่มไดออกซินและพีซีบีเพื่อให้วิธีนี้มี LOQ เป็นไปตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป ซึ่งส่งผลให้มีสารรบกวนมากขึ้นโดยเห็นได้ชัดเจนจากการหว่านล้อมการกลับคืนของ OCDD, OCDF และ PCB 157 ที่คำนวณได้ในช่วงร้อยละ 211.1-397.4 (ตารางที่ 4) ซึ่งสารทั้ง 3 ตัวนี้มีค่าสมมูลความเป็นพิษต่ำมากจึงไม่ส่งผลต่อการคำนวณร้อยละการกลับคืนของผลรวมค่าสมมูลความเป็นพิษของสารทั้งหมด

4) ลดขั้นตอนการทำให้สารสกัดตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้น ปกติสารกลุ่มดังกล่าวจะถูกสกัดออกมาพร้อมกับไขมันและสารรบกวนอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณมากมายมหาศาลเมื่อเทียบกับสารที่สนใจ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้กรดซิลฟริกเข้มข้นและใช้ multilayer silica column เพื่อกำจัดไขมันที่สกัดได้ประมาณ 15 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับห้องปฏิบัติการเคมีสิ่งแวดล้อม คณะเคมี มหาวิทยาลัยอูเมียว ประเทศสวีเดน⁽¹²⁾ ที่ใช้หลักการแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่าน (dialysis) เพื่อกำจัดไขมันที่ไม่เกิน 20 กรัม ซึ่งมีข้อเสียหลักคือต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน และต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะเจาะจงหรือ ใช้ multilayer silica column หลายคอลัมน์ ซึ่งจะต้องใช้ซิลิกาและตัวทำละลายปริมาณมาก และฝ่ายความปลอดภัยของอาหาร สำนักยาและอาหารปลอดภัย กระทรวงสาธารณสุข ประเทศญี่ปุ่น⁽¹³⁾ เลือกใช้ 3 วิธี เพื่อกำจัดไขมันได้แก่ การใช้ Acetonitrile partition การใช้กรดซิลฟริกเข้มข้น และการใช้ multilayer silica column ซึ่งจะต้องใช้เวลาและตัวทำละลายมากขึ้นเมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้

5) ปรับขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยและคณะเลือกใช้เพียง mixed mode solid phase extraction กล่าวคือบรรจุ multilayer silica อยู่บนชั้น basic alumina ซึ่งจะช่วยลดเวลาและปริมาณสารละลายอินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอนที่ใช้คอลัมน์บรรจุของแข็งดูดซับ (solid phase extraction) ชนิด basic alumina⁽¹²⁾ หรือ activated carbon^(12,13) และหลังจากแยกสารทั้งสามกลุ่มออกจากกันแล้ว ต้องนำทั้งสามส่วน (3 fractions) ไประเหยและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย multilayer silica column หรือ activated carbon ผสมซิลิกาอีกครั้ง ซึ่งหมายถึงต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง และยังต้องใช้สารละลายเพิ่มขึ้นด้วย หรือไม่เช่นนั้นก็ต้องใช้โทลูอีนเกรดพิเศษสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซินเท่านั้น ซึ่งล้วนเป็นข้อด้อยเมื่อเทียบกับวิธีที่ทดลองในงานวิจัยนี้

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีในแต่ละหัวข้อ ค่าที่ได้เทียบกับการประกันคุณภาพที่ยอมรับในวิธี US-EPA 1613 revision B⁽⁹⁾ และ US-EPA 1668 revision B⁽¹⁰⁾ พบว่า ความเป็นเส้นตรง (linearity) ของเทคนิค isotope dilution ต้องพิจารณาจากค่า %CV ของค่า relative response ของสารมาตรฐาน 5 ระดับ ต้องไม่เกิน 20% ซึ่งเมื่อเทียบกับที่ได้ในงานวิจัยนี้มีค่าระหว่าง 2.04-12.32% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้งานและมีสารบางตัวที่ใช้เทคนิค internal standard ได้แก่ 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, OCDF และ PCB 138 การพิจารณาความเป็นเส้นตรงต้องพิจารณาจากค่า %CV ของค่า response factor ของสารมาตรฐาน 5 ระดับ ต้องไม่เกิน 35% ซึ่งเมื่อเทียบกับที่ได้ในงานวิจัยนี้สารทั้ง 3 ตัว มีค่าระหว่าง 4.34-7.71% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้งาน

ต่อมาพิจารณาผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีในหัวข้อขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ ในวิธี US-EPA 1613 revision B⁽⁹⁾ และ US-EPA 1668 revision B⁽¹⁰⁾ ไม่มีข้อมูลสำหรับค่า LOQ ในตัวอย่างนมแต่สำหรับ

สหภาพยุโรป⁽¹⁴⁾ ระบุว่า ค่า LOQ ของวิธีควรมีค่าเท่ากับเศษหนึ่งส่วนห้าของค่า ML ซึ่งในตัวอย่างนมกำหนดค่า ML ของสารกลุ่ม PCDDs/Fs เท่ากับ 2.5 pg TEQ/g fat ผลรวมของสารกลุ่ม PCDDs/Fs กับสารกลุ่ม DL-PCBs เท่ากับ 5.5 pg TEQ/g fat และสารกลุ่ม NDL-PCBs เท่ากับ 40 ng/g fat ดังนั้นค่า LOQ ของสารแต่ละกลุ่ม ควรมีค่าประมาณ 0.50 pg TEQ/g fat, 1.1 pg TEQ/g fat และ 8 ng/g fat ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากงานวิจัยนี้เท่ากับ 0.732 pg TEQ/g fat, 1.396 pg TEQ/g fat และ 0.0245 ng/g fat ตามลำดับ ถ้าพิจารณาจากค่านี้สรุปว่าวิธีวิเคราะห์นี้ต้องเพิ่มปริมาณตัวอย่างมากขึ้น เพื่อให้ได้ไขมันเพิ่มขึ้นหรือลดปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดบริสุทธิ์ลงประมาณร้อยละ 25 เพื่อให้ค่า LOQ ของสารกลุ่ม PCDDs/Fs และ LOQ ผลรวมของสารกลุ่ม PCDDs/Fs กับสารกลุ่ม DL-PCBs มีค่าไม่เกินที่สหภาพยุโรปให้การยอมรับ

ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีจากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs และ DL-PCBs ซึ่งสหภาพยุโรป⁽¹⁴⁾ กำหนดไว้ที่หัวข้อจุดวิกฤติ (Analytical criteria) ของวิธีวิเคราะห์ที่กล่าวว่า ผลรวมปริมาณความเป็นพิษสมมูลของสารกลุ่ม PCDDs/Fs สารกลุ่ม DL-PCBs และผลรวมของสารทั้งสองกลุ่ม ที่ระดับ ML หรือระดับ action level ค่าความแม่นยำ (trueness) ของวิธีควรมีค่าอยู่ในช่วง -20% ถึง +20% พบว่างานวิจัยนี้มีค่า $\pm 5.2 \pm 6.5$ และ ± 4.9 ตามลำดับ และความเที่ยงของ within-laboratory reproducibility (RSDR) ของวิธีควรมีค่าน้อยกว่า 15% ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่า 6.77, 5.60 และ 5.02 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าเหล่านี้ กล่าวได้ว่าเหมาะสมสำหรับนำไปใช้งาน

ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีจากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม NDL-PCBs ซึ่งสหภาพยุโรป⁽¹⁴⁾ กำหนดไว้ที่หัวข้อจุดวิกฤติของวิธีวิเคราะห์ (analytical criteria) ที่ระดับ ML หรือระดับ action level ค่าความแม่นยำ (trueness) ของวิธีควรมีค่าอยู่ในช่วง -30% ถึง +30% พบว่างานวิจัยนี้มีค่า ± 3.7 และความเที่ยงของ intermediate precision (RSD) ของวิธีควรมีค่า $\leq 20\%$ ซึ่งงานวิจัยนี้มีค่า 3.54 เมื่อพิจารณาจากค่าเหล่านี้ กล่าวได้ว่าเหมาะสมสำหรับนำไปใช้งาน

นอกเหนือจากการเติมสารมาตรฐานที่สนใจลงในตัวอย่างก่อนสกัด ผู้วิจัยและคณะยังได้ประเมินความแม่นยำของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs ในนมผงอ้างอิง (reference material No 607 Natural spray-dried milk powder) ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ certified value พบว่าใกล้เคียงหรือเมื่อคำนวณเป็นร้อยละการกลับคืนได้ค่าในช่วง 70.0-120.6 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารในระดับ ppt และยังได้ประเมินความแม่นยำของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม NDL-PCBs ในนมผงโดยเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญการกับองค์กรในประเทศฝรั่งเศส ผลการประเมินได้ค่า Z-score อยู่ระหว่าง ± 2 ซึ่งถือว่าพึงพอใจ

สรุป

ผลการศึกษาได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้คือ ได้วิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซิน พีซีบี-คล้ายไดออกซิน และพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินในตัวอย่างนมผงด้วย HRGC/HRMS ซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและต้นทุนต่อหน่วย และได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าเหมาะสมสำหรับนำไปใช้งาน สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการขอรับรองระบบมาตรฐานสากล ISO/IEC17025:2005 และใช้ในงานให้บริการหรืองานวิจัยเชิงสำรวจการปนเปื้อนของสารทั้งสามกลุ่มในนม และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศหรือนำเข้าจากต่างประเทศต่อไป แต่มีข้อควรระวังคือเมื่อมีการตรวจพบสาร OCDD, OCDF และ PCB 157 ปนเปื้อนในตัวอย่างนมผงปริมาณสูงที่ส่งผลกระทบต่อค่าผลรวมสมมูลความเป็นพิษมากกว่าร้อยละ 10 ควรทดลองหาวิธีอื่นเพิ่มเติมเพื่อกำจัดสารรบกวนและเมื่อได้ค่าที่พอใจจึงรายงานผล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวจรรุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
นางลัดดาวัลย์ โรจนพรหมทิพย์ อดีตผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารให้การสนับสนุนการทำงาน
และข้อเสนอแนะ นางพลอยแก้ว เอี่ยมศิริ ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาตัวอย่างและแจกแจงรายละเอียดตัวอย่าง
ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Official Journal of the European Union. Commission regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs [online]. 2011; [cited 2015 Sep 14]; [8 screens]. Available from: URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32011R1259>
2. Reports on tasks for scientific cooperation: assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU Member States. 7 June 2000. Brussels: European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General; 2000.
3. European Food Safety Authority. Results of the monitoring of dioxin levels in food and feed. EFSA Journal 2010; 8(3): 1385. [36 p.]
4. Schrenk D, Chopra M. Dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) in foods [online]. 2013; [cited 2016 April 1]. Available from: URL: [https://books.google.co.th/books?id=-4JwAgAAQBAJ&pg=PA191&lpg=PA191&dq=Dioxins+and+polychlorinated+biphenyls+\(PCBs\)+in+foods+D.+Schrenk+and+M.+Chopra](https://books.google.co.th/books?id=-4JwAgAAQBAJ&pg=PA191&lpg=PA191&dq=Dioxins+and+polychlorinated+biphenyls+(PCBs)+in+foods+D.+Schrenk+and+M.+Chopra)
5. Lake IR, Foxall CD, Fernandes A, Lewis M, Rose M, White O, et al. The effects of flooding on dioxin and PCB levels in food produced on industrial river catchments. Environ Int 2015; 77: 106-15.
6. Malisch R, Kotz A. Dioxins and PCBs in feed and food--review from European perspective. Sci Total Environ 2014; 491-492: 2-10.
7. Debacker N, Sasse A, van Wouwe N, Goeyens L, Sartor F, van Oyen H. PCDD/F levels in plasma of a Belgian population before and after the 1999 Belgian PCB/DIOXIN incident. Chemosphere 2007; 67(9): S217-23.
8. Ghimpeteanu OM, Militaru M, Scippo ML. Dioxins and polychlorinated biphenyls contamination in poultry liver related to food safety - a review. Food Control 2014; 38: 47-53.
9. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Engineering and Analysis Division Method 1613 tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS [online]. 1994; [cited 2015 Sep 14]; [89 screens]. Available from: URL: http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_1613b_1994.pdf
10. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Engineering and Analysis Division Method 1668B Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS [online]. 2008; [cited 2015 Sep 14]; [128 screens]. Available from: URL: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1005EUE.PDF?Dockkey=P1005EUE.PDF>
11. Environmental chemistry laboratory, Department of Chemistry, Umeå University, Analysis of chlorinated aromatic compounds in environmental samples, 10-12-2009. Sweden.
12. Ferrario J, Byrne C, McDaniel D, Dupuy A, Harless R. Determination of 2, 3, 7, 8-chlorine-substituted dibenzo-p-dioxins and -furans at the part per trillion level in United States beef fat using high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry. Anal Chem 1996; 68: 647-52.

13. Department of Food Safety, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labor and Welfare. Guideline for determination of dioxins in food (interim, tentative translation). Feb 2007. Japan
 14. Official Journal of the European Union. Commission regulation (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012 [online]. 2014; [cited 2015 Sep 14]; [26 screens]. Available from: URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32014R0589>
-

Method Development and Validation for analysis of Dioxins, Dioxin-like PCBs and Non Dioxin-like PCBs in Milk Powder by HRGC/HRMS

Supat Sangsuay Sirichai Sunya and Sirinnicha Seemachaisin

*Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi
11000, Thailand*

ABSTRACT Broad toxic and biochemical effects for PCDDs/Fs, DL-PCBs, and NDL-PCBs have been reported in laboratory animals. The most sensitive endpoints are developmental neurobehavioral effects, developmental reproductive effects and immunotoxic effects. More than 90% of human exposure is through food, mainly meat, fish and shellfish, milk and dairy products. It is widely known that the determination of PCDDs/Fs and DL/NDL-PCBs requires special expertise, sophisticated instrumentation as well as a lot of time, manpower and chemical substances. The objective of this study is to develop and to validate a method of analysis of PCDDs/Fs and DL/NDL-PCBs in milk powder. Based on EPA 1613B and 1668B method, the method had been modified by increasing sample weight, changing and adjusting some chemical substances in extraction, cleaning-up procedures and separation of PCDDs/Fs, DL-PCBs and NDL-PCBs in which the limits of quantitation correspond to 0.06 – 0.64, 1.85 and 3.50 pg/g fat, respectively.

Key words: Dioxins, Dioxin-like PCBs, indicator PCBs, milk powder, extraction, HRGC/HRMS

การพัฒนาระบบรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข

เรวดี สิริธัญญานนท์ ชมไลไล สินธุสาร จุไร โชติชนาทวิวงศ์ และวาสิฏฐี แก้วกระจ่าง
สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาระบบรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งเป็นการดำเนินงานตามนโยบายกระทรวงสาธารณสุขที่กำหนดเป็นตัวชี้วัดระดับกระทรวง ในปีงบประมาณ 2557 เพื่อส่งเสริมห้องปฏิบัติการเป้าหมายที่ยังไม่ผ่านการรับรองคุณภาพ หรือห้องปฏิบัติการที่ยังไม่ได้ดำเนินการตามระบบคุณภาพ ให้มีคุณภาพและมาตรฐานการบริการและได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข จำนวน 434 แห่ง โดยมีขั้นตอนสำคัญในการดำเนินการ ได้แก่ การจัดทำมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ประกอบด้วย ข้อกำหนดด้านบริหารและด้านวิชาการ แบบตรวจติดตามและประเมินผล 80 ข้อ การจัดทำกระบวนการตรวจประเมิน การอบรมผู้ปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการให้มีความรู้และความเข้าใจในข้อกำหนด และการจัดทำคู่มือนโยบาย ข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข เพื่อใช้ในการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สังกัดกระทรวงสาธารณสุข โดยห้องปฏิบัติการกลุ่มเป้าหมาย ได้รับการรับรอง 227 แห่ง และกลุ่มนอกเป้าหมาย ได้รับการรับรอง 179 แห่ง รวมเป็น 406 แห่ง และผลการตอบแบบสอบถามเพื่อประเมินผลความพึงพอใจของการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ด้านการบริการ ด้านการตรวจประเมิน และด้านคุณภาพการบริการ คิดเป็นร้อยละ 85.85 84.66 และ 85.81 ตามลำดับ มากกว่าเกณฑ์ความพึงพอใจที่ตั้งไว้ ร้อยละ 80.00 ดังนั้นระบบการรับรองที่จัดทำขึ้น จึงนำไปใช้ในการรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สังกัดกระทรวงสาธารณสุขเป็นกลุ่มแรกได้สำเร็จ และจะขยายการรับรองไปยังห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ภาคเอกชนต่อไป



บทนำ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ส่งเสริมและสนับสนุนให้ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข นำระบบคุณภาพไปดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ตามโครงการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547 – 2550

การส่งเสริมและสนับสนุนทางวิชาการ ให้โรงพยาบาลทุกแห่งในสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข จำนวน 830 แห่ง ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ภาครัฐกลุ่มใหญ่ของประเทศ เล็งเห็นความสำคัญและร่วมมือในการพัฒนาระบบคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล โดยการกำหนดรูปแบบการพัฒนาและเกณฑ์การพัฒนา การแต่งตั้งคณะกรรมการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการชั้นสูงตรสาธารณสุข ตามคำสั่งกระทรวงสาธารณสุข โดยห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการพัฒนาตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ 2544 และมาตรฐานสากล ISO 15189⁽¹⁾

ต่อมาปีงบประมาณ พ.ศ. 2551–2552 กระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้เป็นตัวชี้วัดในแผนการตรวจราชการและนิเทศงานกรณีปกติ โดยห้องปฏิบัติการสามารถเลือกดำเนินการตามระบบคุณภาพมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ (LA) หรือ ISO 15189 Medical laboratories-Particular requirements for quality and competence ตามความเหมาะสมของพื้นที่ และประเมินผลตนเอง (Self-assessment) โดยใช้แบบตรวจประเมินระบบคุณภาพ (Check list) ของมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ 100 ข้อ (คะแนน) สำหรับมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ 2551⁽²⁾ และแบบประเมินผลห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ 243 ข้อ (คะแนน)⁽³⁾ สำหรับการดำเนินการตามมาตรฐาน ISO 15189 เพื่อให้ห้องปฏิบัติการประเมินผลการดำเนินการสอดคล้องกับข้อกำหนดของระบบคุณภาพที่เลือกดำเนินการ และรายงานผลการประเมินคุณภาพเป็นความก้าวหน้าของระดับคะแนนในการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการ โดยกำหนดเป็นระดับการพัฒนา 3 ชั้น

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553–2556 กระทรวงสาธารณสุข สนับสนุนการดำเนินงานตามแผนพัฒนาระบบบริการ (Service plan) โดยจัดระบบเครือข่ายบริการสุขภาพเป็น 12 เครือข่าย แต่ละเครือข่ายมีการบริการทุกระดับตั้งแต่ระดับปฐมภูมิ (Primary Care) ระดับทุติยภูมิ (Secondary Care) และระดับตติยภูมิ (Tertiary Care) โดยมุ่งหวังให้หน่วยบริการแต่ละระดับมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกัน และเชื่อมโยงกันด้วยระบบส่งตรวจต่อ (Referral System) รวมถึงงานบริการทางห้องปฏิบัติการ ที่จะต้องมีการบริหารจัดการทรัพยากรที่มีอยู่อย่างมีประสิทธิภาพและคุ้มค่า เพื่อให้มีการให้บริการสุขภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผู้รับบริการสามารถเข้าถึงการบริการได้อย่างทั่วถึง และมีคุณภาพตามความจำเป็นของการเข้ารับบริการ⁽⁴⁾

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 กระทรวงสาธารณสุข กำหนดยุทธศาสตร์การพัฒนาและจัดระบบบริการที่มีคุณภาพมาตรฐาน ครอบคลุม ประชาชนสามารถเข้าถึงบริการได้โดยกำหนดเป็นตัวชี้วัดระดับกระทรวง (ตัวชี้วัดที่ 14) กำหนดให้ร้อยละ 100 ของห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุขมีคุณภาพและมาตรฐานการบริการ ใน 3 ปี (2557–2559) ดังนั้น ปีที่ 1 ได้รับการรับรองคุณภาพ ร้อยละ 30 ปีที่ 2 ร้อยละ 40 และปีที่ 3 ร้อยละ 100⁽⁵⁾ เพื่อส่งเสริมห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ยังไม่ได้รับการรับรอง หรือยังไม่มีดำเนินการระบบคุณภาพ ให้มีคุณภาพและมาตรฐานการบริการ และได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข โดยมอบหมายให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นผู้กำกับติดตาม และประเมินผลตัวชี้วัดที่ 14 ดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงดำเนินการจัดทำระบบการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข จึงต้องศึกษา และพิจารณาระบบงานที่เหมาะสม เพื่อให้ได้หลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติที่นำไปใช้ดำเนินการได้

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อนำเสนอผลการจัดทำระบบการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข เพื่อนำไปรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สังกัดกระทรวงสาธารณสุข ให้มีคุณภาพและมาตรฐานบริการเป็นที่ยอมรับของผู้รับบริการและประชาชน

วัสดุและวิธีการ

1. สํารวจข้อมูลและจัดกลุ่มเป้าหมาย หองปฏิบัติกาทางกาแพทย ที่ยังไมไดรับการรับรอง หรือยังไมไดดำเนินการตามระบบคุณภาพ และหองปฏิบัติกาทางกาแพทยที่ผานการรับรองตามมาตรฐาน LA, ISO 15189 และมีความสนใจขอการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข

2. จัดทำมาตรฐานหองปฏิบัติกาทางกาแพทยกระทรวงสาธารณสุข เป็นมาตรฐานที่มีข้อกำหนดสอดคล้องตามมาตรฐาน ISO 15189 ดังกล่าว ประกอบด้วย ข้อกำหนดด้านบริหาร และข้อกำหนดด้านวิชาการ แต่มีเนื้อหารายละเอียดน้อยกว่ามาตรฐานสากล

3. จัดทำเกณฑ์การตรวจติดตามและประเมินผลมาตรฐานหองปฏิบัติกาทางกาแพทยและสาธารณสุข โดยจัดทำเป็นแบบตรวจติดตามและประเมินผล (Checklist) 80 ข้อ และกำหนดเกณฑ์การตรวจประเมินข้อกำหนดแต่ละข้อเป็นการให้คะแนน ได้แก่ การดำเนินการตามข้อกำหนดครบถ้วนได้ 2 คะแนน การดำเนินการบางส่วนได้ 1 คะแนน และไม่ได้ดำเนินการได้ 0 คะแนน และจัดประชุมผู้ปฏิบัติงานทางหองปฏิบัติกาให้มีส่วนร่วมในการจัดทำและพิจารณาให้ข้อคิดเห็นด้วย

4. จัดทำระบบการตรวจประเมิน มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ผู้ตรวจประเมิน (auditor) ผู้รับการตรวจประเมิน (auditee) เกณฑ์การตรวจประเมิน (audit criteria) วิธีการตรวจประเมิน และการรายงานผลการตรวจประเมิน

ผู้ตรวจประเมิน (auditor) เป็นผู้ทำหน้าที่ตรวจประเมิน (audit) ที่ผ่านการอบรมหลักสูตรผู้ตรวจประเมิน และใช้ความรู้ตามหลักวิชาการ พิจารณาเพื่อประเมินผลคุณภาพหองปฏิบัติกา โดยผู้ตรวจประเมินที่ผ่านการอบรม จะได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นผู้ตรวจประเมินตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข

ผู้รับการตรวจประเมิน (auditee) หมายถึง หองปฏิบัติกาทางกาแพทยที่รับการตรวจประเมิน

เกณฑ์การตรวจประเมิน (audit criteria) หมายถึง หองปฏิบัติกาทางกาแพทย ที่มีผลการประเมินผ่านเกณฑ์การประเมินเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 80 ของเกณฑ์ติดตามและประเมินผลตามมาตรฐานหองปฏิบัติกาทางกาแพทย กระทรวงสาธารณสุข

วิธีการตรวจประเมิน โดยกำหนดให้ผู้ตรวจประเมินไปตรวจประเมินในพื้นที่ปฏิบัติงานของหองปฏิบัติกาทางกาแพทย และใช้วิธีการตรวจสอบตามแบบตรวจติดตามและประเมินผล (Checklist) 80 ข้อ ดังนี้

4.1 ทีมผู้ตรวจประเมินภายใน (Internal auditor Team) หมายถึง ทีมผู้ตรวจประเมิน จากคณะกรรมการภายในจังหวัด ประกอบด้วย ผู้แทนโรงพยาบาลศูนย์ (รพศ.) โรงพยาบาลทั่วไป (รพท.) และโรงพยาบาลชุมชน (รพช.) ที่สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด เป็นหน่วยประสานงานจัดหาทีมผู้ตรวจประเมิน

4.2 ทีมผู้ตรวจประเมินภายนอก (External auditor Team) หมายถึง ทีมผู้ตรวจประเมิน จากคณะกรรมการภายนอกจังหวัด หรือภายในเขตสุขภาพ ประกอบด้วย ผู้แทนศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ (ศวก.) ผู้แทนโรงพยาบาลศูนย์ (รพศ.) โรงพยาบาลทั่วไป (รพท.) และโรงพยาบาลชุมชน (รพช.) ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นหน่วยประสานงานจัดหาทีมผู้ตรวจประเมิน

ทั้งนี้ กำหนดให้หองปฏิบัติกาทางกาแพทยที่จะขอรับการรับรองต้องมีผลประเมินตนเอง ผลประเมินคุณภาพภายใน (Internal audit) และผลประเมินคุณภาพภายนอก (External audit) ตามลำดับ โดยให้ผู้ตรวจประเมินจัดส่งรายงานผลการตรวจประเมินให้แก่หน่วยประสานงาน เพื่อรายงานในระบบรายงานออนไลน์ที่กำหนด

5. จัดอบรม/ประชุม/สัมมนา ผู้ปฏิบัติงานของหองปฏิบัติกาให้มีความรู้ความเข้าใจในข้อกำหนดระบบคุณภาพ ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ชี้แจงแนวทางการดำเนินการ/มาตรฐาน/เกณฑ์ และสนับสนุนการทำงานแบบเครือข่าย

6. จัดทำระบบรายงานออนไลน์ เพื่อให้หองปฏิบัติกาทางกาแพทยที่จะขอรับการรับรอง รายงานผลประเมินตนเอง สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดดำเนินการรายงานผลประเมินคุณภาพภายใน (Internal audit) และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ดำเนินการรายงานผลประเมินคุณภาพภายนอก (External audit) ตามลำดับ

7. จัดทำข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองระบบบริหารคุณภาพ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ และคณะกรรมการรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ให้การรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ผ่านเกณฑ์การประเมินผล โดยห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่มีผลการประเมินผ่านเกณฑ์การตรวจประเมินจะต้องได้คะแนนเท่ากับ หรือมากกว่าร้อยละ 80 จะได้รับใบรับรอง

8. จัดทำทะเบียนห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข โดยกำหนดเลขทะเบียน ชื่อห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ จังหวัด วันที่ผ่านการรับรอง และวันครบกำหนดการรับรอง

9. จัดทำแบบสอบถามเพื่อประเมินผลความพึงพอใจการดำเนินการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และสาธารณสุข ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ประกอบด้วย ส่วนที่ 1 ข้อมูลห้องปฏิบัติการ ส่วนที่ 2 การบริการ ส่วนที่ 3 การตรวจประเมิน ส่วนที่ 4 คุณภาพการบริการ ส่วนที่ 5 ผลที่ได้รับจากการพัฒนาคุณภาพและได้รับการรับรอง ส่งผลดีต่อห้องปฏิบัติการของท่านอย่างไร และส่วนที่ 6 ข้อเสนอแนะอื่นๆ

ผล

1. ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สังกัดกระทรวงสาธารณสุข รวม 934 แห่ง จำแนกเป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์โรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข (สป.) จำนวน 876 แห่ง และห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สังกัดกรมวิชาการ กระทรวงสาธารณสุข (สธ.) ได้แก่ กรมการแพทย์ กรมควบคุมโรค กรมสุขภาพจิต และกรมอนามัย จำนวน 58 แห่ง ที่มีการดำเนินการระบบคุณภาพ และได้รับการรับรองตามมาตรฐาน LA หรือ ISO 15189 หรือ ทั้ง LA และ ISO 15189 รวม 500 แห่ง และห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ยังไม่ได้รับการรับรอง รวม 434 แห่ง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีการดำเนินการระบบคุณภาพ และได้รับการรับรองตามมาตรฐาน LA และ ISO 15189

มาตรฐาน	ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สังกัด สป. (แห่ง)				ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สังกัดกรมวิชาการ สธ. (แห่ง)	รวม (แห่ง)
	รพศ.	รพท.	รพช.	รวม		
ISO 15189	2	2	10	14	1	15
LA	22	55	380	457	21	478
LA & ISO 15189	2	1	4	7	0	7
ยังไม่ได้การรับรอง	7	25	366	398	36	434
รวม	33	83	760	876	58	934

ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ยังไม่ได้รับการรับรอง เป็นกลุ่มเป้าหมายที่นำมาพิจารณาให้มีการดำเนินการเข้าสู่การรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการ มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข จำแนกเป็นรายเขตบริการสุขภาพ ได้แก่ เขต 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 จำนวน 68, 9, 36, 34, 26, 46, 41, 48, 48, 37, 10 และ 31 แห่ง ตามลำดับ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มเป้าหมาย 434 แห่ง ได้รับการรับรอง 227 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 52.30 ของกลุ่มเป้าหมาย และห้องปฏิบัติการกลุ่มนอกเป้าหมาย ซึ่งได้ผ่านการรับรองระบบคุณภาพตามมาตรฐานอื่นไปแล้ว ได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขเพิ่มอีก 1 มาตรฐาน จำนวน 179 แห่ง ดังนั้น ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ได้รับการรับรองระบบบริหารคุณภาพตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข รวม 406 แห่ง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข

ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์	กลุ่มเป้าหมาย (แห่ง)		กลุ่มนอกเป้าหมาย ที่ได้รับการรับรอง (แห่ง)	รวม
	ทั้งหมด	ได้รับการรับรอง		
โรงพยาบาลศูนย์ (รพศ.)	7	5	7	12
โรงพยาบาลทั่วไป (รพท.)	25	13	18	31
โรงพยาบาลชุมชน (รพช.)	366	198	148	346
สังกัดกรมวิชาการ กระทรวงสาธารณสุข	36	11	6	17
รวม	434	227	179	406

3. ผลตอบแบบสอบถามเพื่อประเมินผลการดำเนินการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข จากห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข จำนวน 406 แห่งตอบกลับ 216 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 53.20 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลมีรายละเอียดดังนี้

3.1 ด้านการบริการ ผลตอบแบบสอบถามที่มีต่อการบริการ 5 ข้อ พบว่า ห้องปฏิบัติการมีความพึงพอใจมากที่สุด เรื่อง การตรวจประเมิน และประเมินผล โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ มีความสะดวก รวดเร็ว และใช้งานง่าย คิดเป็นร้อยละ 88.15 และมีความพึงพอใจน้อยที่สุด เรื่อง การให้ข้อมูล/การสื่อสารฯ คิดเป็นร้อยละ 83.70 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลสำรวจความพึงพอใจที่มีต่อการบริการ

เรื่อง	ระดับความพึงพอใจเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	ร้อยละความพึงพอใจ
1. การให้ข้อมูล/การสื่อสารให้ห้องปฏิบัติการ รับรู้ ข้อกำหนด นโยบาย และเงื่อนไข การรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และสาธารณสุข ตามมาตรฐาน กระทรวงสาธารณสุข	4.19	0.63	83.70
2. แบบตรวจติดตามและประเมินผล (Checklist) ตามเกณฑ์การตรวจติดตาม และประเมินผลมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ด้านการแพทย์และสาธารณสุข มีความชัดเจน และเข้าใจง่าย สามารถนำไปใช้ความพร้อม ของห้องปฏิบัติการ	4.31	0.56	86.11
3. ขั้นตอนการดำเนินการเพื่อให้ได้รับการรับรอง โดยห้องปฏิบัติการประเมินตนเอง ดำเนินการ Internal audit และ External audit ตามลำดับ เพื่อเสนอผลการตรวจประเมินสู่คณะกรรมการฯ	4.26	0.61	85.19

ตารางที่ 3 ผลสำรวจความพึงพอใจที่มีต่อการบริการ (ต่อ)

เรื่อง	ระดับความพึงพอใจเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	ร้อยละความพึงพอใจ
4. การตรวจประเมิน และประเมินผลโดยใช้โปรแกรมออนไลน์ มีความสะดวก รวดเร็ว และใช้งานง่าย	4.41	0.60	88.15
5. รูปแบบและความสวยงามของใบรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข	4.31	0.55	86.11
รวม	4.29	0.59	85.85

3.2 ด้านการตรวจประเมิน ผลตอบแบบสอบถามที่มีต่อการตรวจประเมิน โดยแบ่งเป็นความพึงพอใจที่มีต่อการดำเนินการประเมินคุณภาพภายใน (Internal audit) และการดำเนินการประเมินคุณภาพภายนอก (External audit) พบว่า ห้องปฏิบัติการมีความพึงพอใจต่อการดำเนินการประเมินคุณภาพภายใน ใกล้เคียงกับการดำเนินการประเมินคุณภาพภายนอก (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลสำรวจความพึงพอใจที่มีต่อการตรวจประเมิน

เรื่อง	ระดับความพึงพอใจเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	ร้อยละความพึงพอใจ
1. Internal audit			
1.1 การประสานงานเพื่อรับการตรวจประเมิน	4.19	0.68	83.70
1.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจประเมิน	4.23	0.65	84.63
1.3 ทีมผู้ตรวจประเมิน	4.31	0.63	86.30
1.4 การสื่อสารของทีมผู้ตรวจประเมินในขณะตรวจประเมิน	4.23	0.66	84.63
ค่าเฉลี่ย	4.24		84.81
2. External audit			
2.1 การประสานงานเพื่อรับการตรวจประเมิน	4.15	0.70	83.06
2.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจประเมิน	4.17	0.67	83.43
2.3 ทีมผู้ตรวจประเมิน	4.33	0.68	86.57
2.4 การสื่อสารของทีมผู้ตรวจประเมินในขณะตรวจประเมิน	4.25	0.68	85.00
ค่าเฉลี่ย	4.23		84.51

3.3 ด้านคุณภาพการบริการ ผลตอบแบบสอบถามที่มีต่อคุณภาพการบริการ 5 ข้อ พบว่า ห้องปฏิบัติการมีความพึงพอใจต่อคุณภาพการบริการมากที่สุด เรื่อง ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ปรากฏบนใบรับรอง มีความถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 89.17 และมีความพึงพอใจน้อยที่สุด เรื่อง ระยะเวลาที่รอคอยใบรับรอง คิดเป็นร้อยละ 83.70 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลสำรวจความพึงพอใจที่มีต่อคุณภาพการบริการ

เรื่อง	ระดับความพึงพอใจเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	ร้อยละความพึงพอใจ
1. รายงานผลการตรวจประเมิน External audit มีรายละเอียดและผลคะแนนถูกต้อง ครบถ้วนตามที่ได้รับการตรวจประเมินจริง	4.26	0.64	85.19
2. ระยะเวลาที่ห้องปฏิบัติการได้รับทราบผลการตรวจประเมิน External audit	4.20	0.63	84.07
3. การประกาศผลห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองทางเว็บไซต์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	4.38	0.64	87.69
4. ระยะเวลาที่รอคอยใบรับรอง	4.15	0.64	82.96
5. ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ปรากฏบนใบรับรอง มีความถูกต้อง	4.46	0.57	89.17
รวม	4.29	0.62	85.81

วิจารณ์

การพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการ ในช่วงเริ่มต้นของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มุ่งเน้นให้มีการนำระบบคุณภาพไปดำเนินการ จึงกำหนดงบประมาณและกิจกรรมในการจัดอบรมความรู้ด้านข้อกำหนดของระบบคุณภาพ และการพัฒนาห้องปฏิบัติการให้สอดคล้องตามข้อกำหนดและมาตรฐานสากล ดำเนินการประเมินผลระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการโดยการประเมินตนเอง (Self assessment) จึงเป็นผลการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการ ที่ยังไม่มีระบบการรับรองห้องปฏิบัติการ ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ดำเนินการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่องประมาณ 10 ปี และในปีงบประมาณ 2557 ได้จัดทำระบบการรับรอง เพื่อรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สังกัดกระทรวงสาธารณสุข ให้สอดคล้องกับตัวชี้วัดระดับกระทรวง ตัวชี้วัดที่ 14 ร้อยละของห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุขมีคุณภาพและมาตรฐานการบริการ โดยมีการดำเนินการสำรวจกลุ่มเป้าหมาย กำหนดให้เป็นกลุ่มห้องปฏิบัติการที่ยังไม่ผ่านการรับรองตามมาตรฐานใด หรือยังไม่มีระบบคุณภาพ เพื่อส่งเสริมการดำเนินการระบบคุณภาพในห้องปฏิบัติการทุกแห่ง และประชาชนได้รับบริการที่มีคุณภาพเท่าเทียมกันในทุกเขตสุขภาพ

การจัดทำระบบการรับรอง จะขึ้นกับมาตรฐานที่ดำเนินการ ซึ่งหน่วยรับรองอาจจัดทำขึ้นโดยลำพังและประกาศใช้ หรือการมีส่วนร่วมจากผู้เกี่ยวข้อง⁽⁶⁾ โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำ (ร่าง) มาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และจัดทำ (ร่าง) แบบตรวจติดตามและประเมินผล (Checklist) 80 ข้อ ที่สอดคล้องตามมาตรฐาน ISO 15189 และมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ (LA) ด้วยการมีส่วนร่วมคิด ร่วมทำ และร่วมแสดง

ความคิดเห็นของผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และแบบตรวจติดตามและประเมินผลได้รับการยอมรับ รวมทั้งมีส่วนร่วมพิจารณารายละเอียด ทำให้ผู้ใช้งานเข้าใจได้ง่าย นำไปปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทุกระดับ ทั้งโรงพยาบาลชุมชน (รพช.) โรงพยาบาลทั่วไป (รพท.) และโรงพยาบาลศูนย์ (รพศ.) รวมทั้งห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลสังกัดกรมการแพทย์ กรมควบคุมโรค กรมสุขภาพจิต และกรมอนามัย สามารถดำเนินการระบบคุณภาพตามมาตรฐานนี้ได้

การตรวจประเมิน โดยทีมผู้ตรวจประเมิน และวิธีการตรวจประเมินที่กำหนดให้มีการตรวจประเมินคุณภาพภายใน (Internal audit) และการตรวจประเมินคุณภาพภายนอก (External audit) เพื่อดำเนินการเปรียบเทียบวิธีปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการกับมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องวิธีปฏิบัติงานกับมาตรฐานที่กำหนด⁽⁷⁾ และกำหนดเกณฑ์การตรวจติดตามและประเมินผลว่าจะต้องได้คะแนนเท่ากับ หรือมากกว่าร้อยละ 80 จึงจะได้รับใบรับรอง ตามคู่มือนโยบาย ข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ส่งผลให้ผู้ปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการ เมื่อได้รับฟังการชี้แจงจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีแนวทางการพัฒนาตนเองที่ชัดเจน เพื่อให้ผ่านเกณฑ์การตรวจติดตามและประเมินผล และจะได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข

การจัดทำระบบข้อมูลและสารสนเทศ โดยจัดทำระบบรายงานออนไลน์ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่จะขอรับการรับรอง ทีมผู้ตรวจประเมินคุณภาพภายใน และทีมผู้ตรวจประเมินคุณภาพภายนอก รายงานผลประเมินคุณภาพในระบบรายงานออนไลน์ ตามลำดับ เป็นการใช้เทคโนโลยีเพื่ออำนวยความสะดวกในการรายงานผลที่ผู้ปฏิบัติงานประเมินตนเอง และมีการประมวลผลคะแนนออกมา ลดภาระงาน ไม่เสียเวลา และทีมผู้ตรวจประเมินคุณภาพภายใน รวมทั้งทีมผู้ตรวจประเมินภายนอก สามารถนำข้อมูลมาพิจารณาประกอบการตรวจประเมิน นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำรายงาน ทำให้แล้วเสร็จรวดเร็ว เพื่อเสนอคณะกรรมการรับรองฯ พิจารณาผลการตรวจประเมิน และให้การรับรอง และสามารถนำเสนอผลการตรวจประเมินของห้องปฏิบัติการที่มีผลการตรวจประเมินรวม 406 แห่ง เพื่อให้การรับรองได้ภายในปีงบประมาณที่ดำเนินการในปีแรกได้ สอดคล้องกับผลตอบแบบสอบถามความพึงพอใจเพื่อประเมินผลการดำเนินการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข จากห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรอง เป็นข้อมูลที่ทำให้ผู้วิจัยได้รับทราบความคิดเห็นที่มีต่อการจัดทำระบบการรับรองดังกล่าว โดยในหัวข้อด้านการบริการ ผลตอบแบบสอบถามที่มีต่อการบริการ 5 ข้อ พบว่า ห้องปฏิบัติการมีความพึงพอใจมากที่สุด เรื่องการตรวจประเมิน และประเมินผล โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ มีความสะดวก รวดเร็ว และใช้งานง่าย คิดเป็นร้อยละ 88.15 จึงอาจกล่าวได้ว่า การจัดทำระบบรายงานออนไลน์ เป็นเครื่องมือสำคัญที่ส่งผลให้การนำระบบการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขไปดำเนินการ (Implement) รับรองกลุ่มเป้าหมายจำนวนมากได้สำเร็จ

ผลการรับรองห้องปฏิบัติการกลุ่มเป้าหมายที่ยังไม่ได้รับการรับรอง 227 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 52.30 ของกลุ่มเป้าหมายที่กำหนดไว้ จะพบว่าผลการดำเนินการได้สูงกว่าเป้าหมายที่กำหนดไว้ในกรอบตัวชี้วัดระดับกระทรวง ที่ระบุไว้ว่า ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต้องได้รับการตรวจประเมิน และตรวจสอบรับรองคุณภาพในเวลา 3 ปี ดังนั้นปีที่ 1 ร้อยละ 30 ปีที่ 2 ร้อยละ 70 และปีที่ 3 ร้อยละ 100⁽⁸⁾ เพื่อส่งเสริมบุคลากรในห้องปฏิบัติการให้ได้แรงกระตุ้นการพัฒนาคุณภาพจากการตรวจประเมิน Internal audit และ External audit รวมทั้งการได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ทำให้ห้องปฏิบัติการได้รับความเชื่อมั่นจากผู้รับบริการ และทำให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการมีความเชื่อมั่นในการทำงานมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นโอกาสที่จะได้รับการรับรองคุณภาพตามมาตรฐานอื่นต่อไป

การได้รับความสนใจจากห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ กลุ่มที่ผ่านการรับรองระบบคุณภาพตามมาตรฐานอื่นไปแล้ว และได้รับการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขเพิ่มอีก 1 มาตรฐาน จำนวน 179 แห่ง โดยพบว่าจากแบบสอบถามเพื่อประเมินผลการดำเนินการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ในหัวข้อผลที่ได้รับจากการพัฒนาคุณภาพและได้รับการรับรองส่งผลดีต่อห้องปฏิบัติการของ

ท่านอย่างไร และหัวข้อ ข้อเสนอแนะอื่นๆ ทำให้ทราบว่า ห้องปฏิบัติการดำเนินการขอรับรองมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขเพิ่มอีก 1 มาตรฐาน เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าห้องปฏิบัติการมีการให้บริการที่มีคุณภาพได้ทั้งตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข และมาตรฐานวิชาชีพ รวมทั้งการดำเนินการตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขเป็นการดำเนินการที่ใช้งบประมาณไม่มาก ไม่มีค่าใช้จ่ายในการยื่นขอรับรองการได้รับการตรวจประเมินและผ่านการรับรองจะเป็นขวัญและกำลังใจแก่ผู้ปฏิบัติงาน

ผลตอบแบบสอบถามด้านการตรวจประเมิน พบว่า ห้องปฏิบัติการมีความพึงพอใจต่อวิธีการ และผู้ตรวจประเมิน Internal audit และ External audit ใกล้เคียงกัน คิดเป็นร้อยละ 84.81 และ 84.51 ตามลำดับ สอดคล้องกับนโยบาย และตัวชี้วัดระดับกระทรวงที่ต้องการให้ห้องปฏิบัติการได้รับการตรวจประเมิน ภายใต้การสนับสนุนที่ดีของผู้บริหาร และได้รับการรับรองระบบบริหารคุณภาพ จะช่วยให้ประชาชนได้รับบริการทางห้องปฏิบัติการที่เป็นที่ยอมรับ และยังแสดงถึงความร่วมแรงร่วมใจ อย่างสมานฉันท์ ของบุคลากรกระทรวงสาธารณสุข⁽⁹⁾ เพื่อสร้างเครือข่ายห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในระดับจังหวัด และเขต ให้มีสายสัมพันธ์ที่ดี และเชื่อมโยงกันต่อไป

ผลตอบแบบสอบถามด้านคุณภาพการบริการ พบว่า ห้องปฏิบัติการมีความพึงพอใจมากที่สุด เรื่อง ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ปรากฏบนใบรับรอง มีความถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 89.17 และมีความพึงพอใจน้อยที่สุด เรื่อง ระยะเวลาที่รอคอยใบรับรอง คิดเป็นร้อยละ 82.96 เนื่องจากห้องปฏิบัติการผ่านการรับรองในเดือนสิงหาคม 2557 แต่สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการจะเก็บใบรับรองตัวจริงไว้ เพื่อจัดพิธีมอบใบรับรองในเดือนพฤศจิกายน 2557 จึงอาจจะต้องพิจารณาจัดงานพิธีมอบใบรับรองภายในปีงบประมาณที่ให้การรับรอง หรือสอบถามความต้องการให้จัดส่งใบรับรองตัวจริงไปยังห้องปฏิบัติการ

การจัดทำระบบการรับรองขึ้นมา จะต้องขึ้นขั้นตอนการดำเนินงานต่างๆ ได้แก่ มาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข แบบตรวจติดตามและประเมินผล (Checklist) 80 ข้อ ทีมผู้ตรวจประเมินและวิธีการตรวจประเมินที่ประกอบด้วย การตรวจประเมินคุณภาพภายใน และการตรวจประเมินคุณภาพภายนอก ระบบรายงานออนไลน์ รวมทั้งข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองที่กำหนดเกณฑ์การตรวจประเมินจะต้องได้คะแนนเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 80 จึงจะได้รับใบรับรอง และยังมีปัจจัยสำคัญ ได้แก่ นโยบายกระทรวงสาธารณสุขที่ชัดเจน และสื่อสารประชาสัมพันธ์ เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องเข้าใจตรงกัน ส่งผลให้การนำระบบการรับรองที่จัดทำขึ้น เพื่อให้การรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขนำไปใช้ปฏิบัติอย่างได้ผล

บทสรุป

การพัฒนาการรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขขึ้นมา เพื่อให้สามารถนำไปใช้ดำเนินการได้ทันภายในปีงบประมาณ 2557 ตามตัวชี้วัดระดับกระทรวงเป็นเรื่องเร่งด่วน และมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องและต้องควบคุมหลายประการ การพัฒนาระบบงานนี้ จึงใช้กลวิธีเชิงวิจัยและพัฒนาซึ่งสามารถใช้ได้กับงานใหม่ทุกงาน⁽¹⁰⁾ และทำให้เกิดระบบงานการรับรองตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ที่นำไปใช้ดำเนินการรับรองตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ได้ รวมทั้งทำให้ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สังกัดกระทรวงสาธารณสุขได้มีแนวทางการจัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อตอบสนองต่อข้อจำกัด และสร้างทางเลือกในการดำเนินการระบบคุณภาพ และส่งเสริมห้องปฏิบัติการให้เข้าร่วมเป็นเครือข่ายพัฒนาคุณภาพบริการทางห้องปฏิบัติการกับห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองตามมาตรฐานอื่นได้ภายในจังหวัด ขยายสู่ระดับเขต และส่งผลถึงคุณภาพการบริการทางห้องปฏิบัติการของประเทศที่เข้มแข็งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ด้วยความตระหนักในความสำคัญของการประสานงาน และความร่วมมือที่ได้รับจากทุกท่านและทุกหน่วยงาน ทั้งภายในและภายนอกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงขอขอบพระคุณผู้บริหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อธิบดี (นายแพทย์อภิชัย มงคล) และรองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (นางจุรีภรณ์ บุญยวงศ์วิโรจน์) ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเฉพาะนางสาวเกษร บุญยรักษ์โยธิน ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11/1 ภูเก็ต ที่เป็นผู้จัดทำร่างแบบตรวจติดตามและประเมินผล ตามเกณฑ์การตรวจติดตามและประเมินผลมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข ผู้ประสานงานและผู้ให้ทุนของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกแห่ง รวมทั้งนายแพทย์สาธารณสุขจังหวัด ผู้ประสานงานในแต่ละจังหวัดทั่วประเทศ และผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่ให้ความร่วมมือดำเนินการรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ส่งผลให้การดำเนินงานลุล่วง และประสบความสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการชั้นสูงมาตรฐานสุขของโรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ปีงบประมาณ 2550. กรุงเทพฯ : องค์การทหารผ่านศึก; 2551.
2. วรณิกา มโนรมย์, นัยนา วัฒนศรี และสมชัย เจิตเสริมอนันต์ มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ 2551 สำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์. กรุงเทพฯ : สภาเทคนิคการแพทย์; 2552.
3. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สำหรับโครงการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการชั้นสูงมาตรฐานสุขของโรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ : ประชาชน; ม.ป.ป.
4. สำนักบริหารการสาธารณสุข สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. เอกสารการประชุมสัมมนาเพื่อพัฒนาระบบบริการสุขภาพส่วนภูมิภาค. วันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2555; โรงแรมมิราเคิลแกรนด์. นนทบุรี : สำนักบริหารการสาธารณสุข สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2555.
5. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. ยุทธศาสตร์ ตัวชี้วัด และแนวทางการจัดเก็บข้อมูลกระทรวงสาธารณสุข ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557. นนทบุรี : สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข; 2557.
6. Riley WJ, Bender K, Lownik E. Public health department accreditation implementation: transforming public health department performance. Am J Public Health 2012; 120(2): 237-42.
7. Erasmus RT, Zemlin AE. Clinical audit in the laboratory. J Clin Pathol 2009; 62(7):593-7.
8. สำนักตรวจและประเมินผล สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. แผนการตรวจราชการกระทรวงสาธารณสุข ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557. นนทบุรี : สำนักตรวจและประเมินผล สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2557.
9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คุณภาพและมาตรฐานบริการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ รังสีวินิจฉัย และหน่วยบริการปฐมภูมิ ปี 2557. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2557.
10. จงดี ว่องพินัยรัตน์, ปันตดา ชิลวา และอานวย เพชรชูพงศ์. ระบบการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ สำหรับตรวจคนหางานเพื่อไปทำงานต่างประเทศ : การวิจัยเชิงพัฒนา. ว กรมวิทย์ พ 2543; 42(4): 274-9.

Development of Medical Laboratory Certification System According to Ministry of Public Health Standard

Raevadee Siritunyanont Chomchailai Sinthusarn Jurai Chotichanathawewong and Wasittee Kaewkrajang

Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT The Department of Medical Sciences had developed Laboratory Quality System Certification according to Ministry of Public Health (MOPH) standard which is the policy of the Ministry of Public Health defined as a KPI in fiscal year 2014 in order to strengthen 434 laboratories that had not yet neither been certified nor implemented quality system to be certified according to the MOPH standard. The important steps in implementation of the laboratory certification system are preparation of the medical laboratory standards including management and technical requirements as well as the checklist for audit and assessment 80 items, preparation of the audit process, training on the quality system requirements for all laboratory staff, and preparation of quality manual, requirements and condition of laboratory certification according to the MOPH standard. Two hundred and twenty seven laboratories of the target group and 179 laboratories of non target group, totally 406 laboratories of 934 laboratories, had been certified. The results from the questionnaires to evaluate the satisfaction of the MOPH certification system showed that the satisfaction in the field of service, audit system, and service quality was 85.85, 84.66 and 85.81 percent respectively. All satisfaction were higher than the predefined criteria at 80.00 percent. Thus, the implementation of this established certification system conducted for the MOPH laboratories showed satisfactory achievement and would be extended to the medical laboratories in private sector.

Key words: certification of quality management system, Ministry of Public Health (MOPH) Standard

Accepted for publication, 10 June 2016

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ เอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสของพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ปนัดดา เทพอักษร อภิชัย ประชาสุภาพ ดวงรัตน์ จุลอักษร อณิชา เลื่องชัยเชวง
สกุลรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์ และพรทิพย์ ไชยยะ
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การศึกษาที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้พัฒนาพลาสมิด pcDNA-pLDHAbHCY/LCK/C10 ที่บรรจุยีนอิมูโนโกลบูลินที่จำเพาะต่อเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสของ *Plasmodium falciparum* (pLDH) เพื่อใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ pLDH การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อ pLDH ในเซลล์ 293F โดยศึกษาอัตราส่วนของพลาสมิดที่มีในท้องตลาด pEGFP-N1 ต่อปริมาตรน้ำยา transfection ที่นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์พบว่าอัตราส่วนระหว่างพลาสมิดดังกล่าวต่อน้ำยา transfection คือ 1 µg: 1.2 µl และเมื่อใช้อัตราส่วนดังกล่าวในการนำพลาสมิด pcDNA-pLDHAbHCY/LCK/C10 เข้าสู่เซลล์ 293F พบว่าการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากการ transfection เมื่อทดสอบโดยวิธี ELISA การศึกษาคุณสมบัติของรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดย SDS-PAGE และ Western blotting พบว่า มีลักษณะไม่แตกต่างจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนูและพบว่ารีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะกับ pLDH ของเชื้อ *P. falciparum* ในเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อทดสอบโดยวิธี IFA ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างได้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปพัฒนาสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum*

Introduction

Antibody is a glycoprotein that is produced from B-lymphocytes in response to antigen, of which produced from a single clone of B-lymphocyte called monoclonal antibody (MAb). MAbs have been widely used in biomedicine especially for development of diagnostics and therapeutic agents.^(1,2) Hybridoma technique, a method for development of hybridoma that produced MAb, was developed by Köhler and Milstein in 1975 by fusion of splenocytes which consist of various cell populations of lymphocytes including B lymphocytes from spleen of immunized mouse with immortal cancer cells.^(3,4) The obtained hybridoma had both properties from mother cells: B lymphocytes and myeloma cells that could secrete antibodies and perform continuous growth, respectively.⁽⁵⁾ The production of MAb from hybridoma cells can be performed by injection of hybridoma into the abdomen of a mouse called the ascites method, or culturing in flask or bioreactor as in vitro methods.⁽⁶⁾ But concerning animal welfare, many countries in Europe and United States of America have banned or have laws and guidelines for limiting the ascites method of MAb production. Cultivation of hybridoma cells in flask or bioreactor was expensive and time-consuming.⁽⁷⁾ Furthermore both methods were limited to no long term monoclonal antibody production because hybridoma cells were not stable.⁽⁸⁾

The recombinant DNA technology can be used to produce antibodies as recombinant monoclonal antibody especially in mammalian cells, by isolation of immunoglobulin gene from various sources of cells and cloning into expression vectors to express proteins in culture cells.^(9,10,11,12,13) In previous study we have developed a recombinant plasmid containing immunoglobulin gene encoding monoclonal antibody against lactate dehydrogenase enzymes of *Plasmodium falciparum* (pLDH) for using in malarial diagnosis. In order to produce the recombinant monoclonal antibody by transient expression in mammalian cells, the optimal condition for protein expression should be determined. Therefore, this study was aimed to optimize primarily the transfection reagent used for transfection of the recombinant plasmid for expression of the MAb against pLDH in 293F cells modified from human embryonic kidney (HEK) 293 cell line that has been widely used for transient protein expression.^(14,15) The obtained conditions was expected to use for production of recombinant monoclonal antibody against pLDH for further study in various malaria research and the experiments will be applied for optimization of expression of various proteins in mammalian cells.

Materials and Methods

1. Plasmids

1.1 pcDNA-pLDHAbHC γ LCK/C10

The plasmid pcDNA-pLDHAbHC γ LCK/C10 containing immunoglobulin heavy chain and light chain gene encoding monoclonal antibody against lactate dehydrogenase enzymes from *Plasmodium falciparum* (Medical Biotechnology Center, Medical Life Sciences Institute,

Department of Medical Sciences) was previously prepared, briefly, the variable region of heavy chain (V_H) and light chain (V_L) genes from scFv clone10 producing single chain variable fragment (scFv) antibody against pLDH were assembled together with mouse C γ and CK for expression of recombinant monoclonal antibody against pLDH by blunt end cloning using restriction enzymes *HpaI* for V_H and *AfeI* for V_L , and then cloned into pcDNA3.4 containing C γ and CK, respectively.

1.2 pEGFP-N1

pEGFP-N1 (Clontech) encodes green fluorescence protein (GFP) with bright fluorescence and high expression in mammalian cells.^(16, 17, 18)

2. Recombinant plasmodium lactate dehydrogenase enzymes antigen (pLDH)

The plasmid pET:LDH was previously prepared, briefly, the pLDH gene encoding for pLDH antigen of *P. falciparum* was amplified by PCR using specific primers to create restriction sites of *EcoRI* and *Sall*, at upstream and downstream of the PCR product. After gel purification the PCR product was digested with *EcoRI* and *Sall* restriction enzymes and ligated with expression vector pET-21a (Novagen) which digested with the same restriction enzymes. The obtained recombinant plasmid was named pET:LDH.

Recombinant pLDH protein was prepared as previously described, briefly, the recombinant *E. coli* BL21(DE3) containing recombinant plasmids pET: pLDH were cultured in 100 ml LB medium and induced with 0.1 mM Isopropyl thiogalactoside (IPTG). Then cell pellets were harvested by centrifugation and sonicated in lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl and 2.5 mM Imidazole, pH 8.0). After centrifugation the soluble protein pLDH in supernatant was purified using Ni-NTA resin (QIAGEN) according to manufacturer's protocol. The obtained purified protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting and stored at -20°C in 50% glycerol.

3. Cell and cell culture media

The FreestyleTM 293F cells (InvitrogenTM, Life Technologies) were propagated in disposable polycarbonate erlenmeyer flask with FreestyleTM 293 expression medium (InvitrogenTM, Life Technologies). The viable cells were determined by Trypan blue exclusion method.⁽¹⁹⁾ The cells were continuously cultured until the density of 1×10^6 viable cells/ml was reached, then the cells were subcultured to density of $1-2 \times 10^5$ viable cells/ml in 15 ml of fresh medium by incubating at 37°C and 8% CO_2 with orbital shaking at 140 rpm.

4. Parasites

The parasites, *Plasmodium falciparum* strain K1 were maintained by culture in erythrocyte (blood group O) at 1% hematocrit in 10 ml RPMI1640 medium with 25 mM HEPES, 2 mg/ml glucose, 5% sodium bicarbonate and 10% human serum (blood group AB). The culture was incubated in a humidified incubator at 37°C with gas controlled environment of 5% CO_2 , 5% O_2 and 90% N_2 which was fed according to the established procedure.⁽²⁰⁾

5. Optimization of pEGFP-N1: Transfection reagent ratio in 293 F cells

The 293F cells were cultured in 12 well plate at density of 1×10^6 cells/ml in 0.8 ml Freestyle™ 293 expression medium for 24 hours before transfection. Prior to transfection, the reagents were prepared as followings; 2 µg of pEGFP-N1 was diluted in Opti Pro SFM (Gibco, Life Technologies) to the total volume of 16 µl in 1.5 ml centrifuge tube for 6 tubes, and transfection reagent (Gen Carrier-1™, Epoch Life Science) was diluted individually in Opti Pro SFM at 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 and 3.2 µl to the total volume of 16 µl, respectively. After mixing both reagents together and incubating at room temperature for 20 minutes, the DNA-Transfection reagent complexes were added directly to each well, mixed gently and continued culturing with rotating at 140 rpm, 37°C and 8% CO₂ for 24 hours. The cell morphology and expression of GFP protein in each condition was observed under an inverted fluorescence microscope (EclipseTi-S, Nikon) at 24 hours post transfection.

6. Transfection of pcDNA-pLDHAbHCγLCK/C10 into 293 F cells

293F cells were seeded into 30 ml of Freestyle™ 293 Expression medium with density of $6 \times 10^5 - 7 \times 10^5$ cells/ml in 125 ml conical cell culture flask (Corning®, Sigma-Aldrich). The culture was incubated in a humidified incubator at 37°C and 8% CO₂ with orbital shaking at 140 rpm for 24 hours before transfection. On the day of transfection, the cells were counted to maintain the density of 1×10^6 cells/ml. To perform transfection using the obtained optimal condition of the plasmid DNA:Transfection reagent in 30 ml cell culture, 75 µg of recombinant plasmid pcDNA-pLDHAbHCγLCK/C10 and 90 µl transfection reagent were each diluted in Opti Pro™ SFM to a total volume of 0.6 ml. Both reagents were mixed and incubated for 20 minutes at room temperature. 1.2 ml DNA-Transfection reagent complexes was added to the prepared cells dropwise and gently mixed the plate. Transfected cell culture was incubated at 37°C and 8% CO₂ with orbital shaking at 140 rpm for 7 days, using untransfected condition as negative control. The supernatant of transfected cell culture was collected daily at day 1-7 post transfection for ELISA assay. After that the culture supernatant were harvested for purification of recombinant monoclonal antibody.

7. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Four hundred microliter of culture supernatant of day 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 were collected from transfected cell culture and carried out to determine specific reactivity with recombinant pLDH protein by ELISA. Each 96 well plate was coated with 100 µl of carbonate bicarbonate buffer pH 9.6 containing 1 µg of recombinant pLDH protein at 4°C overnight. Then the plate was washed 3 times with 300 µl PBS and blocked with blocking buffer (PBS buffer containing 8% skim milk powder (Difco™, Becto Dickinson and Company) for 1 hour at room temperature. After washing, 100 µl of each sample was added to each well and incubated at room temperature for 1 hour. The plate was washed with PBST (PBS containing 0.05% Tween 20) for 3 times following with PBS 1 time then incubated with 100 µl of Rabbit anti-mouse immunoglobulins-HRP (Dako Cytomation) at dilution 1:2,000 for 1 hour. After washing with Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST) for

4 times and 1 time with Phosphate Buffered Saline (PBS), 100 µl of TMB substrate solution (KPL, USA) was added to each well and incubated at room temperature for 30 minutes. After that 100 µl of 1 M HCL was added to stop the reaction and the plate was measured absorbance at 450 nm with reference absorbance at 630 nm.

8. Purification of recombinant protein

The recombinant monoclonal antibody was purified from the culture supernatant by Affinity chromatography using Protein A Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare Life sciences). The column was packed with 500 µl of Protein A Sepharose™ Fast Flow and equilibrated with 10 ml binding buffer (20 mM NaHPO₄ pH 7.0), then the culture supernatant containing recombinant antibody was applied through the column and washed the column with 10 ml of binding buffer. After that the bounded recombinant monoclonal antibody was eluted from the column by adding 1 ml of elution buffer (0.1 M Sodium citrate pH 3.0) following immediately with the addition of 100 µl neutralizing buffer (1M Tris-Cl pH 9.0). The purified recombinant monoclonal antibody was concentrated and changed the buffer to PBS pH 7.2 using an ultra-centrifugation filter of 10 kDa (Amicon, Merck Millipore). The purified protein was analyzed to determine the concentration using Nanodrop® spectrophotometer (ND-1000, Nano Drop Technologies, Inc.) and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting against Rabbit anti-mouse IgG-HRP (Dako Cytomation), and then stored at -20°C until used.

9. Immunofluorescence assay (IFA)

Indirect immunofluorescence staining was carried out using purified recombinant monoclonal antibody against pLDH and mouse monoclonal antibody against pLDH (Arista Biologicals Inc, USA) as positive control. *P. falciparum* infected red blood cells from the cultures were harvested at 5% parasitemia, then the cells were smeared on microslide and fixed with cold 40% methanol in acetone at -80°C for 1 hour. Then 10 µl of 1mg/ml anti-pLDH mouse monoclonal antibody at dilution 1:100 or 1 mg/ml purified recombinant monoclonal antibody at the same dilution was added to the cells and incubated at room temperature for 45 minutes. The slide was washed 3 times with PBS and air dried. Ten microliter of Rabbit anti-mouse IgG (H + L) - FITC (Southern Biotech) at dilution 1:200 was added and the slide was incubated at room temperature for 30 minutes. The slide was then washed 3 times with PBS and air dried. After mounting with 10% glycerol in PBS and covering with a cover slip, the slide was observed under fluorescence microscope (EclipseNi, Nikon).

Results

1. Production of recombinant pLDH protein for ELISA

The recombinant plasmid pET: pLDH containing ORF of pLDH that was cloned inframe with 6 histidine residues (6 × His) was used for expression of pLDH-His fusion protein in *E. coli* BL21.

The obtained purified recombinant pLDH protein was shown the molecular weight of 33 kDa as analyzed by SDS-PAGE and Western blotting in (Figure 1).

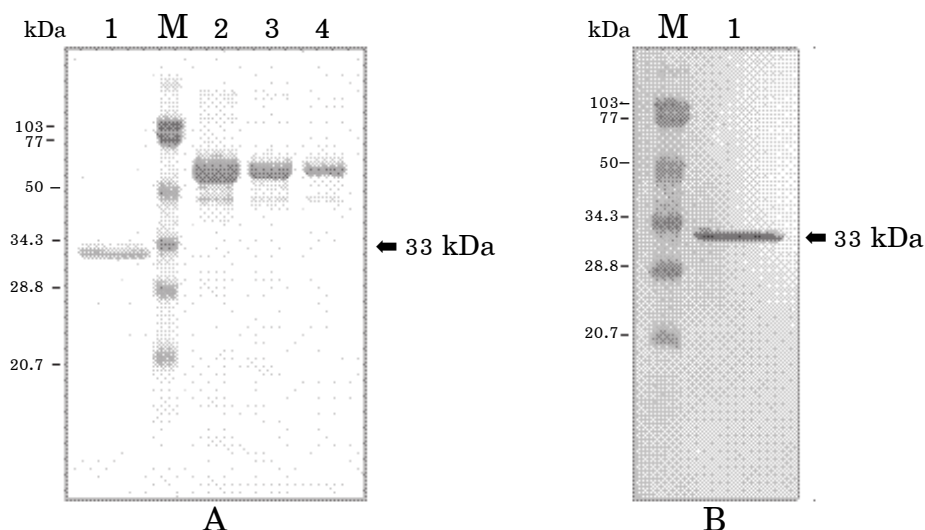


Figure 1 SDS-PAGE and Western blotting of purified recombinant pLDH protein

A: The affinity chromatography purified recombinant pLDH protein was analyzed by SDS-PAGE

B: Western blotting using anti-His monoclonal antibody

In A and B, lane 1 is purified recombinant pLDH protein and M is protein marker (Prestained SDS-PAGE standards Low Range, Bio-Rad) while lane 2-4 in A are bovine serum albumin standard at 20, 10 and 5 mg/ml, respectively.

2. Optimization of pEGFP-N1: Transfection reagent ratio for transfection into 293 F cells

To determine the optimal condition of the plasmid DNA to Transfection reagent ratio for transfection into 293F cells, various conditions of transfection were performed as shown in (Figure 2A) under inverted fluorescence microscope. The transfected cells in all conditions had normal morphology compared to non-transfected cells. The expression of GFP in transfected cells was observed under the same microscope and the fluorescence density was estimated by eye. As shown in (Figure 2B) the highest fluorescence density was visually detected at pEGFP-N1. Transfection reagent ratio of $1\mu\text{g}:1.2\mu\text{l}$. Noteworthy, the expression was not increased even the transfection reagent was increased up to $3.2\mu\text{l}$ as shown that the fluorescence density was not increased when using conditions of pEGFP-N1: Transfection reagent ratio $1\mu\text{g}:1.4\mu\text{l}$ and $1\mu\text{g}:1.6\mu\text{l}$.

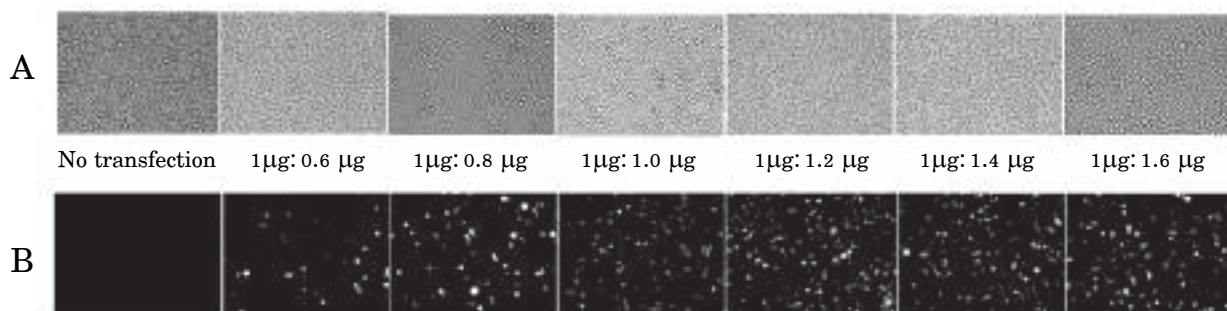


Figure 2 Optimization of pEGFP-N1: Transfection reagent ratio for transfection into 293F cells
Various ratios of pEGFP-N1: Transfection reagent for transfection into 293F cells were determined. Cell morphology was observed under inverted fluorescence microscope at x20 magnification (A) and GFP expression was observed under the same microscope (B).

3. Determination of recombinant protein expression by ELISA

The reactivity of recombinant protein expressed by transfection of pcDNA-pLDHAbHC γ LCK/C10 into 293F cells ELISA was performed to determine the expression level of recombinant monoclonal antibody against pLDH in the supernatant of transfected cell cultures from day1-7 post transfection. The results showed that the expression of the recombinant monoclonal antibody was increased rapidly from day 0-4 and not increased more afterwards until day 7 of the study as shown in (Figure 3).

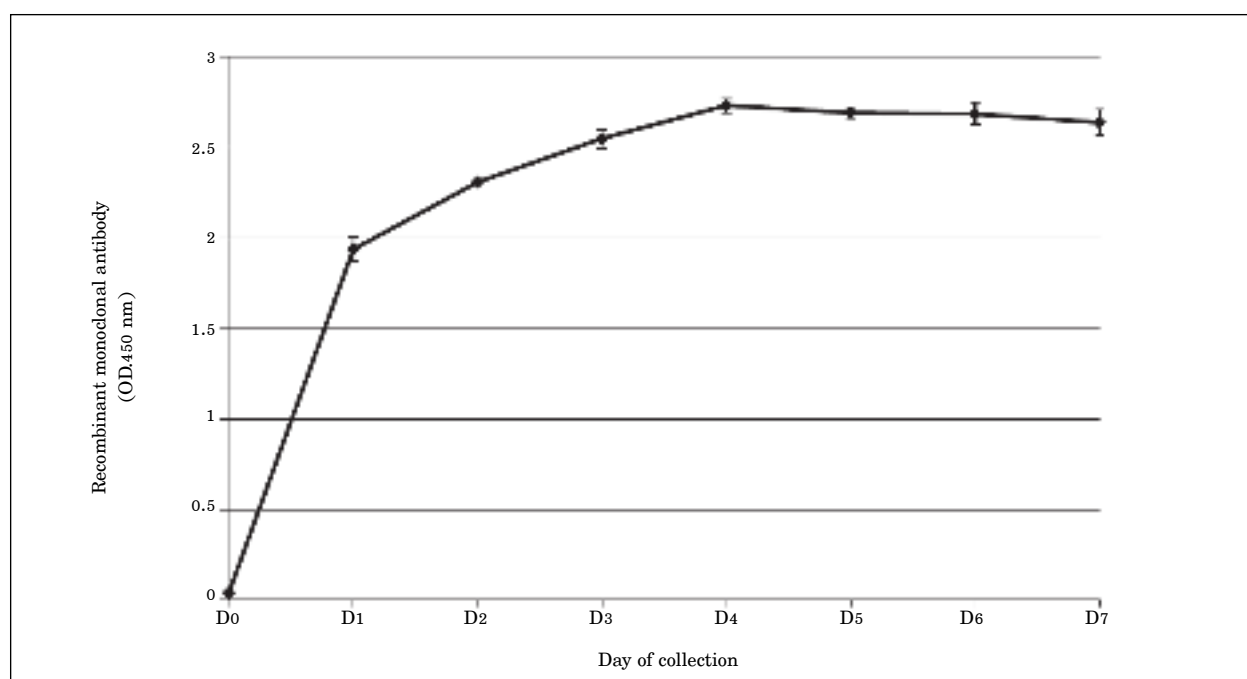


Figure 3 Determination of recombinant monoclonal antibody against *P. falciparum* LDH expression by ELISA

The supernatant of 293F transfected cell cultures transfected with pcDNA-pLDHAbHC γ LCK/C10: Transfection reagent ratio at 1 µg: 1.2 µl from day 1-7 post transfection were collected and determined the expressed recombinant monoclonal antibody against *P. falciparum* LDH by ELISA at absorbance 450 nm using culture medium before transfection (D0) as negative control.

4. Analysis of purified recombinant protein by SDS PAGE and Western-blot

The recombinant plasmid pcDNA-pLDHAbHC γ LCK/C10 containing immunoglobulin heavy chain and light chain genes encoding monoclonal antibody against pLDH was transfected into 293F cells to produce recombinant monoclonal antibody by using the obtained optimal condition. After 7 days of transfection the culture supernatant was collected and purified by Affinity Chromatography. The obtained purified protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using mouse monoclonal antibody against pLDH as positive control. As shown in (Figure 4A) the recombinant monoclonal antibody and positive control had the same patterns with two major bands of 25 kDa for light chain and 50 kDa for heavy chain, respectively. The result of Western blotting in (Figure 4B) showed that the recombinant monoclonal antibody had specific reactivity to Rabbit anti- mouse IgG as same as the positive control.

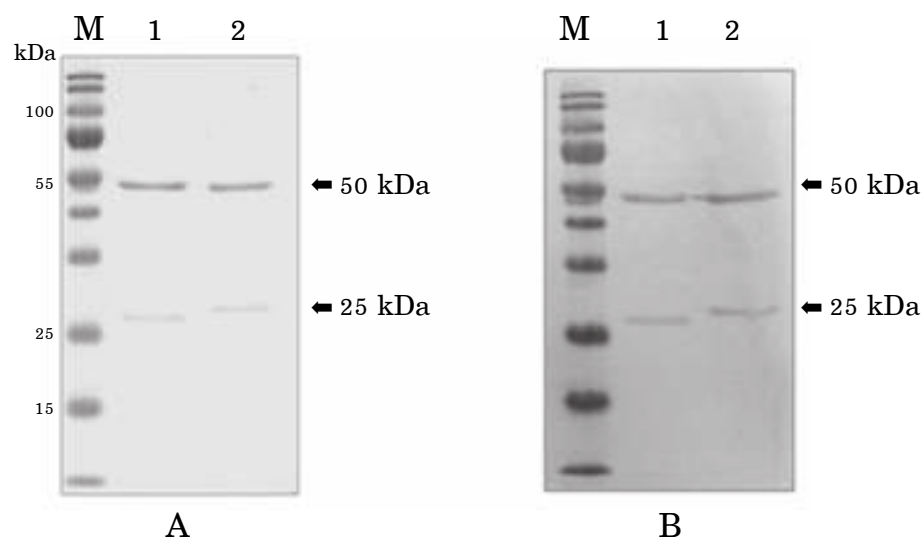


Figure 4 SDS-PAGE and Western blotting of purified recombinant protein against *P. falciparum* LDH

The purified recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE (A) and by Western-blot (B). Lane 1 is mouse monoclonal antibody against pLDH (positive control), lane 2 is purified recombinant monoclonal antibody against pLDH, which M is protein marker (PageRuler™ prestained protein ladder, Thermo Scientific).

5. Determination of specific reactivity of recombinant protein by IFA

To determine recombinant protein antigen in *P. falciparum* infected cells, the IFA was performed while the mouse monoclonal antibody against pLDH was used as positive control. As shown in (Figure 5) when the infected cells were stained with purified recombinant monoclonal antibody against pLDH produced, the specific immunofluorescence was observed under fluorescence microscope (D) that had the same pattern as of that stained with positive control (B). Whereas, there was no specific signal observed in non-infected cells that were stained with positive control (A) and recombinant monoclonal antibody against pLDH (C), respectively.

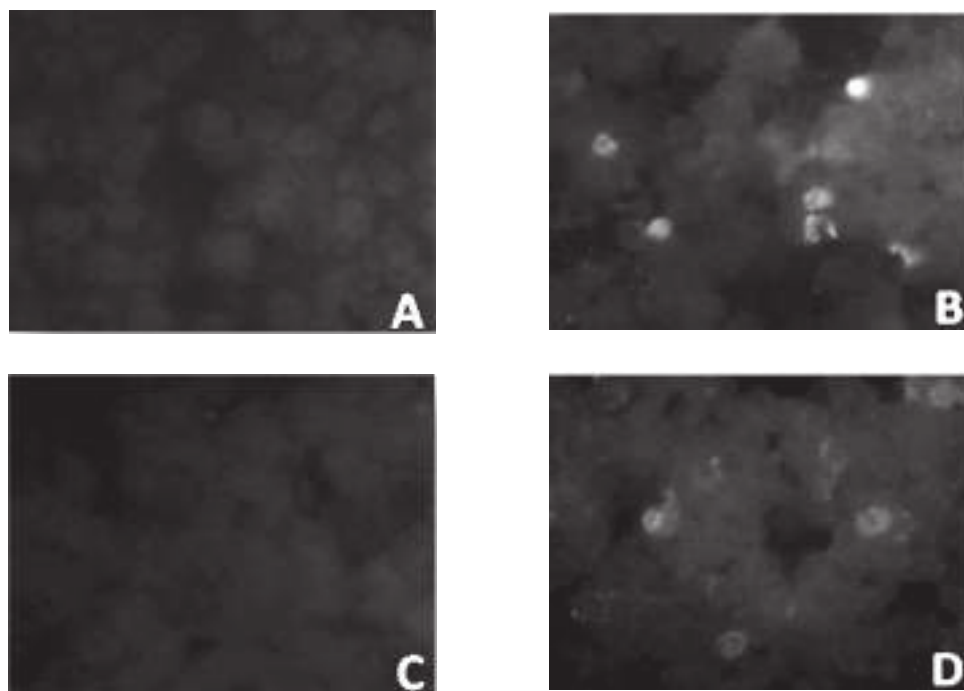


Figure 5 Determination of specific reactivity of recombinant monoclonal antibody produced against *P. falciparum* LDH to *P. falciparum* infected red blood cells by IFA

Non infected and *P. falciparum* infected red blood cells were stained with mouse monoclonal antibody against pLDH (positive control) in A and B and stained with purified recombinant monoclonal antibody produced against pLDH in C and D, respectively. Specific immunofluorescence was observed under fluorescence microscope at 100x magnification.

A: Non infected red blood cells stained with mouse monoclonal antibody against pLDH

B: *P. falciparum* infected red blood cells stained with mouse monoclonal antibody against pLDH (positive control)

C: Non infected red blood cell stained with purified recombinant monoclonal antibody against *P. falciparum* LDH

D: *P. falciparum* infected red blood cells stained with purified recombinant monoclonal antibody against *P. falciparum* LDH

Discussion

In this study the plasmid pcDNA-pLDHAbHCγLCK/C10 containing immunoglobulin heavy chain and light chain genes was used for expression of recombinant monoclonal antibody against *Plasmodium falciparum* LDH (pLDH). The optimal protein expression was developed by optimizing transfection condition using pEGFP-N1 containing reporter gene expressed GFP protein of which fluorescence signal in living cells can be visually detected and had been reported as the advantage of this protein by Chalfie *et al.*⁽²¹⁾

The results showed that with various conditions of different volumes of the transfection reagent studied (1.2–3.2 μl/0.8 × 10⁵ 293F cells) the morphology of cells was normal as compared to non-transfected cells at 24 hours post transfection. Khodthong *et al* also studied in Hela cells and

found that toxicity of transfection reagent to the cells could be detected at 24 hours post transfection, whereas at 8 hours post transfection morphology of cells was normal.⁽²²⁾ These suggested that there was no toxicity to the cells due to these volumes.

In this study the obtained optimal condition for transfection into 293F cells was the ratio of pEGFP-N1 to Transfection reagent at 1 µg:1.2 µl, which was used to scale up for expressing recombinant monoclonal antibody against pLDH using pcDNA-pLDHAbHCγLCK/C10 in 293F cells and the optimal time was determined during day 1-7 post transfection. The recombinant monoclonal antibody in supernatant of transfected cell cultures from day 1-7 were determined for their specific reactivity to pLDH by ELISA. The recombinant monoclonal antibody could be detected from day 1 and increased rapidly to day 4 which showed the same pattern of recombinant monoclonal antibodies expression in HEK 293E cells using standard protocol transfection.⁽²³⁾ From day 5, the level of recombinant monoclonal antibody was not increased, it is assumed that plasmids were too diluted due to environmental factors and cell division that led to decrease of expression.⁽²⁴⁾

As the purified monoclonal antibody was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting which the results revealed the specific light chain and heavy chain approximately at 25 and 50 kDa⁽²⁵⁾, respectively, the molecular weight of light chain of recombinant monoclonal antibody was found slightly higher than those of mouse monoclonal antibody against pLDH, it might be due to difference of amino acid sequence of both monoclonal antibodies. Furthermore, the recombinant monoclonal antibody could react specifically with pLDH antigen in *P. falciparum* infected cells by IFA suggested that it could detect pLDH antigen in native form. From the study, the recombinant monoclonal antibody against pLDH produced by the optimal condition developed, had potential to use further in development for *P. falciparum* malarial diagnosis.

Conclusion

In this study we obtained the optimal condition of the ratio of pcDNA-pLDHAbHCγLCK/C10 to transfection reagent as 1 µg:1.2 µl for transfection into 293F cells to express monoclonal antibody against *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and the highest amount was obtained by day 4 post transfection. The affinity chromatography purified recombinant monoclonal antibody had specific reactivity with pLDH antigen in *P. falciparum* infected cells by IFA.

References

1. Saleem M, Kamal M. Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application. *Afr J Biotechnol* 2008; 7(8): 923-5.
2. Drewe E, Powell RJ. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathol* 2002; 55(2): 81-85.
3. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-7.

4. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2010; 1(2): 88-94.
5. Hybridoma technology. [online].2015; [cited 2015 Jul 7]; [1 screen]. Available from: URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Hybridoma_technology#Method.
6. Marx U, Embleton MJ, Fischer R, Gruber FP, Hansson U, Heuer J, et al. Monoclonal antibody production: The report and recommendations of ECVAM Workshop 23. *ATLA* 1997; 25(2): 121-37.
7. National Research Council (US) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. Monoclonal antibody production [online]. 1999; [cited 2015 Jun 22]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100192>.
8. Castillo FJ, Mullen LJ, Grant BC, Deleon J, Thrift JC, Chang LW, et al. Hybridoma stability. *Dev Biol Stand* 1994; 83: 55-64.
9. Skerra A, Plückthun A. Assembly a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 1988; 240(4855): 1038-41.
10. Ho M, Nagata S, Pastan I. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *PNAS* 2006; 103(25): 9637-42.
11. Galeffi P, Lombardi A, Pietraforte I, Novelli F, Donato MD, Sperandei M, et al. Functional expression of a single-chain antibody to Erb-2 in plants and cell-free systems. *J Transl Med* 2006; 4: 39.
12. Choo ABH, Dunn RD, Broady KW, Raison RL. Soluble expression of a functional recombinant cytolytic immunotoxin in insect cells. *Protein Expr Purif* 2002; 24(3): 338-47.
13. Zhang RY, Shen WD. Monoclonal antibody expression in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 2012; 907: 341-58.
14. Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: E9.
15. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 51: 187-200.
16. CLONTECH Laboratories, Inc. PEGFP-N1 vector information. [online]. 1999; [cited 2015 Jul 27]; [3 screens]. Available from: URL: <https://shigen.nig.ac.jp/medaka/download/strain/pEGFP-N1.pdf>.
17. Inouye S, Tsuji FI. Aequorea green fluorescence protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994; 341: 277-80.
18. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111: 229-33.
19. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2001; Appendix 3: Appendix 3B.
20. Markler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48(2): 205-10.
21. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescence protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802-5.
22. Khodthong C, Ismaili I, Juckem L. The Impact of transfection mediated toxicity-gene expression and cytotoxicity analysis of transfection reagents. [online]. 2012; [2015 Jun 20]; [10 screens]. Available from: URL: https://www.mirusbio.com/assets/misc_technical_documents/the_impact_of_transfection_mediated_toxicity.pdf.

23. Backliwal G, Hildinger M, Chenuet S, Wulhfard S, De Jesus M, Wurm FM. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(15): e96.
 24. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397(8): 3173-8.
 25. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(202): S41-52.
-

Transfection Optimization for Expression of the Recombinant Monoclonal Antibody against *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase in Mammalian Cells

Panadda Dhepakson Apichai Prachasuphap Duangrat Jullaksorn

Anicha Luengchaichaweng Sakulrat Soonthornchattrawat and Porntip Chaiya

Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences. Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT Recombinant plasmid pcDNA-pLDHAbHC γ LCK/C10 containing immunoglobulin gene encoding monoclonal antibody against lactate dehydrogenase enzyme of *Plasmodium falciparum* (pLDH) has been developed in our previous study. This study was aimed to optimize the condition of transfection reagent for expression of the recombinant monoclonal antibody against pLDH in 293F cells. By optimizing transfection condition for a commercial pEGFP-N1 plasmid to transfection reagent, the optimal ratio was at 1 μ g:1.2 μ l in 293F cells. By this ratio, the plasmid pcDNA-pLDHAbHC γ LCK/C10 was also transfected into 293F cells to express the recombinant monoclonal antibody and maximal level was found in culture supernatant at day 4 as determined by ELISA. The recombinant monoclonal antibody protein pattern was similar to that of the mouse monoclonal antibody against pLDH as analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Furthermore, this monoclonal antibody could react specifically to pLDH antigen in *P. falciparum* infected cells by IFA. Thus, the recombinant monoclonal antibody had potential in development for *P. falciparum* malarial diagnosis.

Key words: Recombinant *Plasmodium falciparum* monoclonal antibody, 293F cells, transfection, *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase

การศึกษาคุณภาพของหัวดองดึง

ทัศนีย์ ปานผดุง สายใจ ปริยะวาที สายัน ชุนนุช และนฤมล บุญราศรี

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สงขลา 90000

บทคัดย่อ ดองดึง (Dong-Dueng) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosa superba* Linn. อยู่ในวงศ์ Liliaceae ตำรายาไทยใช้หัวเป็นยาแก้ปวดข้อ ซึ่งมีรายงานพบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ คือ โคลชิซิน แต่ยังไม่มีการบรรจุข้อกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรชนิดนี้เข้าในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำข้อกำหนดคุณภาพทางเคมีและกายภาพ โดยเก็บตัวอย่างหัวดองดึงจากแหล่งธรรมชาติและซื้อจากร้านขายยาแผนโบราณในประเทศไทยจำนวน 15 ตัวอย่าง ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่าง ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด มีค่าเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 20.92 ± 2.41 , 2.70 ± 0.93 , 8.75 ± 0.82 , 4.57 ± 1.22 และ 1.10 ± 1.03 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ รวมทั้งได้มีการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพและใช้เป็นข้อมูลสำหรับจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานของดองดึงต่อไป



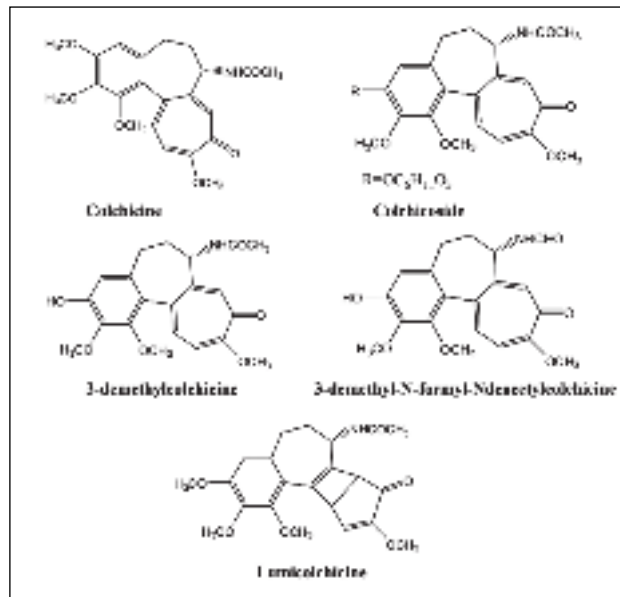
บทนำ

ตองดึง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosa superba* Linn. อยู่ในวงศ์ Liliaceae มีชื่ออื่น เช่น กำมปู้ (ชัชนาท) คมขวาน บ้องขวาน หัวขวาน (ชลบุรี) ดาวดึงส์ กำมปู้ (ภาคกลาง) พันมหา (นครราชสีมา) มะขาไก่ (ภาคเหนือ) หมอยหิยา (อุดรธานี) เป็นไม้ล้มลุกเลื้อยเกาะพันต้นไม้อื่น ยาวได้ถึง 5 เมตร ลำต้นเป็นหัวหรือเหง้าขนาดเล็กอยู่ใต้ดิน รูปร่างกลมเรียวยาว มีหงอนเหมือนขวานใบเดี่ยวเรียงสลับ หรือเรียงเป็นวงรอบข้อ 1-3 ใบรูปขอบขนานแกมรูปใบหอก ยาว 5-15 เซนติเมตร ไร้ก้าน ปลายใบแหลมยืดยาวออกทำหน้าที่เป็นมือเกาะ โคนใบมน เส้นใบขนานกันไปสิ้นสุดที่ปลายใบ หลังใบ และท้องใบเรียบ ขอบใบเรียบ ดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ ออกที่ซอกใบ ใกล้ปลายเถา สีเหลือง ปลายกลีบสีแดง โคนกลีบเมื่อบานใหม่ๆ มีสีเหลือง เมื่อดอกบานเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ทั้งดอกมีกลีบ 6 กลีบ สีเขียวอ่อน และจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและแดง กลีบรูปแถบ เรียวยาว 5-7.5 เซนติเมตร โค้งกลับไปทางก้านดอก ขอบกลีบหยักเป็นคลื่น เกสรเพศผู้มี 6 อัน ชี้ออกเป็นรัศมีตามแนวนอน ก้านยาว 3-5 เซนติเมตร อับเรณูยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ก้านเกสรเพศเมียยาว 0.3-0.7 เซนติเมตร แยกเป็น 3 แฉก ก้านดอกยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ผลเป็นฝัก แห้งแตกได้ รูปกระสวย ปลายผลแหลม ขนาดกว้าง 2.5-3 เซนติเมตร ยาว 6-8 เซนติเมตร ผิวเรียบ มักมีสันตื้นๆ มี 3 พู เมล็ดกลมสีส้มแกมน้ำตาลจำนวนมาก พบตามป่าดงดิบเขาชื้น ที่รกร้างว่างเปล่าที่มีความชุ่มชื้นสูง⁽¹⁾ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ส่วนของหัวหรือเหง้า ใบ ดอก และผลของตองดึง

สารเคมีที่พบได้ในตองดึงประกอบด้วย 1, 2-ไดดีเมธิลโคลชิซิน (1, 2-didemethylcolchicines) 2, 3-ไดดีเมธิลโคลชิซิน (2, 3-didemethylcolchicine) เอ็น-ดีอะซีทิล โคลชิซิน (N-deacetylcolchicines) โคลชิโคไซด์ (Colchicoside) โกลริโอซิน (Gloriosine) ซูเพอบิน (Superbine) ลูมิโคลชิซิน (Lumicolchicine) 3-ดีเมธิล-เอ็น-ดีเมธิล-เอ็น-ดีฟอมิล-เอ็น-ดีอะซีทิลโคลชิซิน (3-demethyl-N-deformyl-N-deacetylcolchicine) 3-ดีเมธิลโคลชิซิน (3-demethylcolchicine) เอ็น-ฟอมิล-ดีอะซีทิลโคลชิซิน (N-formyl-deacetylcolchicine) แทนนิน (Tannins) กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) สเตอรอล (Sterols)⁽²⁾ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 สารสำคัญที่พบในสมุนไพรทองดึง

โคลชิซีน (Colchicine) เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์มีคุณสมบัติละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ ในทางการแพทย์นำมาใช้รักษาโรคเกาต์ไขข้ออักเสบ ความเป็นพิษของโคลชิซีน มีรายงานขนาดความเป็นพิษ 7-60 มิลลิกรัม โดยพบมีรอยไหม้ที่ปากและคอ อาเจียน ระคายเคือง เป็นไข้ อาการปวด และไตวาย การทำงานที่ผิดปกติของอวัยวะหลายระบบเกิดขึ้นภายใน 24 - 72 ชั่วโมง จนทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ ยังไม่มียาด้านฤทธิ์โคลชิซีนโดยตรง แต่เป็นการดูแลแบบประคับประคอง การรักษาภาวะสมดุลของเกลือแร่ที่ผิดปกติและการให้สารน้ำทดแทนอย่างเพียงพอ⁽³⁾

จากคัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ หัวทองดึงมีรสร้อนเมา ใช้แก้โรคปวดข้อ โรคเรื้อน ลมจุกเสียด ขับผายลม ปวดกล้ามเนื้อ แก้โลหิตและลม โดยมีการนำไปใช้ในตำรับยาหลายตำรับ เช่น ยาประสะการบูร ยาแก้ระดูขัด ยาขับโลหิต ยาแสงพระอาทิตย์ ยาวาโยไชย ยาเขียวทรพิษ ยาอำมะฤคควาที่ ยาแก้ริดสีดวงจมูก^(4,5) แต่เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานของทองดึงในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย จึงได้ทำการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีและคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของหัวทองดึงเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐาน สำหรับการควบคุมคุณภาพของหัวทองดึงแห้งในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสมุนไพร

สมุนไพรทองดึงที่ใช้ในการศึกษานี้คือส่วนที่เป็นหัวจากแหล่งธรรมชาติผ่านการตรวจสอบชนิดพืชที่ถูกต้องตามหลักพฤกษอนุกรมวิธานโดยนักพฤกษศาสตร์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosa superba* Linn. วงศ์ Liliaceae จำนวน 3 ตัวอย่าง และซื้อจากร้านขายยาแผนโบราณในแต่ละภาคของประเทศไทยในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 จำนวน 12 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดและผ่านร่อนเบอร์ 80

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BT 224S ของบริษัท Sartorius

เตาเผาอุณหภูมิสูง รุ่น 6000 ของบริษัท Thermolyne

เครื่องเขย่า รุ่น SA-31 ของบริษัท YAMATO

ตู้อบร้อน รุ่น ULE600 ของบริษัท Memmert
 เตาบุนวม รุ่น LG 2/ER ของบริษัท Isopad™
 เตาไฟฟ้า รุ่น C-MAG HS10 ของบริษัท IKA
 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น W 350T ของบริษัท Memmert
 อ่างน้ำความถี่สูง รุ่น Transonic ของบริษัท ELMA
 แผ่นแก้วเคลือบซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F₂₅₄) ขนาด 20 × 20 มิลลิเมตร ความหนา 0.25 มิลลิเมตร
 ของบริษัท Merck
 ตู้ตรวจวัดแสงอัลตราไวโอเล็ต ของบริษัท Camag

สารมาตรฐานและสารเคมี

- 1) สารเคมีเป็นชนิดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ (analytical grade)
- 2) สารละลาย 5% วานิลีนในกรดกำมะถัน

วัสดุและวิธีการ

วิธีการ

1. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง (Thin layer chromatography)

1.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำผงสมุนไพรหัวตองดึงแห้ง 5 กรัม เติมน้ำเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 20 มิลลิลิตร สก๊ตในอ่างน้ำความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที นำมาเขย่าเป็นเวลา 30 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.4) นำสารละลายที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร ไประเหยบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิจนแห้ง ละลายกลับด้วยเอทานอล 1 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

นำโคลชิซิน 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร

1.3 การเตรียมน้ำยาแยก (developing solvent)

ชนิดที่ 1 ผสม benzene: ethyl-acetate: diethylamine: methanol อัตราส่วน 50:40:10:8 ให้เข้ากัน นำสารละลายมาใส่ในถังทำโครมาโทกราฟี แล้วทิ้งไว้ให้อิ่มตัวอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนใช้

ชนิดที่ 2 ผสม ethyl-acetate: methanol: ammonium solution อัตราส่วน 85:10:5 ให้เข้ากัน นำสารละลายมาใส่ในถังทำโครมาโทกราฟี แล้วทิ้งไว้ให้อิ่มตัวอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน

1.4 วิธีการ

นำสารละลายสารมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบชนิดละ 3 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ มาแต้มบนแผ่นกระดาษเคลือบด้วยซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F₂₅₄) ในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 2.5 เซนติเมตร และให้มีระยะห่างระหว่างสารละลายแต่ละจุดไม่น้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้งนำไปตั้งในถังทำโครมาโทกราฟีที่มีน้ำยาแยกทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวสูง 12 เซนติเมตร นำแผ่นโครมาโทแกรมชนิดผิวบางออกจากถัง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน แล้วนำไปตรวจสอบ

1.5 การตรวจสอบ

1) ตรวจสอบสเปกตรัมด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สังเกตตำแหน่งและสีของแถบสารที่ทึบแสง

2) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สังเกตตำแหน่งและสีของแถบสารที่เรืองแสง

3) ตรวจสอบโดยพ่นด้วยสารละลาย 5% วานิลีนในกรดกำมะถัน ทิ้งไว้ให้แห้ง ให้ความร้อนบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สังเกตตำแหน่งและสีของแถบสารภายใต้แสงธรรมชาติ

2. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

2.1 วิธีการหาปริมาณความชื้น

ตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁶⁾ โดยชั่งผงหัวตอดึงที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 5 กรัม ลงในขวดซึ่งที่ทราบน้ำหนักคงที่ (อบภาชนะที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น บันทึกน้ำหนัก) นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ นำไปอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนัก 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 12.5 มิลลิกรัม) บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณความชื้น

2.2 การหาปริมาณเถ้ารวม

ตามวิธีการที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁷⁾ โดยชั่งผงหัวตอดึงที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 2 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักคงที่ (เผาภาชนะที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น บันทึกน้ำหนัก) นำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ได้เถ้าที่ปราศจากสีดำ ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้ารวม

2.3 การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

ตามวิธีการที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁷⁾ โดยนำเถ้ารวมในถ้วยกระเบื้องมาเติมกรดเกลือเจือจาง (10% w/v) 25 มิลลิลิตร และนำไปต้มบนเตาไฟฟ้า 5 นาที เริ่มจับเวลาเมื่อเถ้าในถ้วยกระเบื้องเริ่มหมุนวน กรองด้วยกระดาษกรองชนิดที่ปราศจากเถ้า (Whatman No. 41) ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน จนน้ำล้างตะกอนเปลี่ยนจากกรดเป็นกลาง นำเถ้าที่กรองได้และกระดาษกรองใส่ลงในถ้วยกระเบื้องใบเดิม ทำให้แห้งบนเตาไฟฟ้า และนำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

2.4 การหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ

ตามวิธีการที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁷⁾ โดยหั่นผงหัวตอดึง 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนด้วยน้ำที่อิมัลชันด้วยคลอโรฟอร์ม จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วมีฝาปิด (glass-stopper conical flask) เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 6 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงใน evaporating dish ที่ทราบน้ำหนักคงที่ (อบภาชนะที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น บันทึกน้ำหนัก) แล้วนำไประเหยบนอ่างอังไอน้ำจนแห้ง นำ dish ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ นำไปอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนัก 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัม) บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่ได้

2.5 การหาปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล

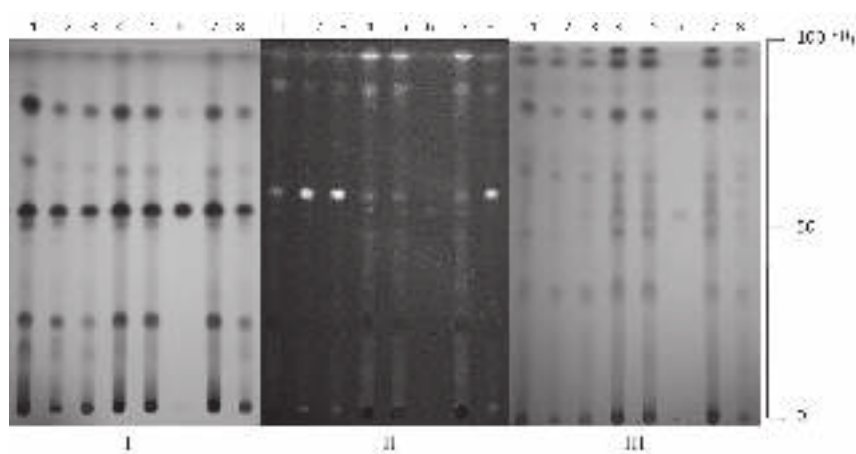
ทำตามวิธีที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย แต่เปลี่ยนใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 95 และคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลที่ได้⁽⁷⁾

ผล

1. การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิบบาง

การตรวจสอบสารสำคัญ คือโคลชิซินโดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิบบาง สามารถตรวจพบโดยให้ผลทึบแสงเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้ผลเรืองแสงสีเหลืองเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และให้แถบสีเหลือง เมื่อพ่นด้วยสารละลาย 5% วานิลลินในกรดกำมะถัน แล้วนำไปให้ความร้อน (ภาพที่ 3)

การตรวจสอบสารสกัดเอทานอลของตองดึงทั้ง 15 ตัวอย่าง ในน้ำยาแยกชนิดที่ 1 benzene: ethyl-acetate: diethylamine: methanol ในอัตราส่วน 50:40:10:8 พบว่า แสดงแถบของสารที่ตำแหน่งเดียวกัน 11 แถบ มีค่า R_f ในช่วง 16-20, 23-25, 30-35, 48-50, 51-55, 60-61, 65-67, 81-83, 86-89, 93-95 และ 96-98 เมื่อเทียบกับสารสำคัญ คือ โคลชิซิน มีค่า R_f ในช่วง 51-55 (ตารางที่ 1) โดยให้ผลทึบแสง เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้ผลเรืองแสงสีเหลืองเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และให้แถบสีเหลือง เมื่อพ่นด้วยสารละลาย 5% วานิลลินในกรดกำมะถัน แล้วนำไปให้ความร้อน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากหัวตองดึงแห้ง โดยใช้ น้ำยาแยก ชนิดที่ 1 ส่วนผสมของ benzene: ethyl-acetate: diethylamine: methanol ในอัตราส่วน 50 : 40 : 10 : 8

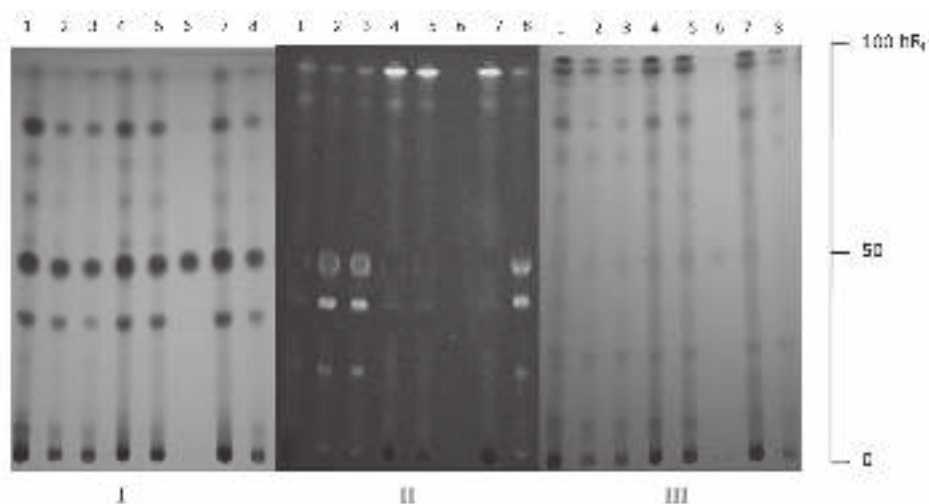
- 1 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC01 (authentic)
- 2 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC02 (authentic)
- 3 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC03 (authentic)
- 4 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC04
- 5 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC05
- 6 = สารมาตรฐานโคลชิซิน
- 7 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC06
- 8 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC07
- I = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
- II = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร
- III = ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น 5% วานิลลินในกรดกำมะถันและให้ความร้อน 105 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ค่า hR_f ของสารสกัดจากหัวตองตึงแห้ง โดยใช้น้ำยาแยก ชนิดที่ 1 ส่วนผสมของ benzene: ethyl-acetate: diethylamine: methanol ในอัตราส่วน 50:40:10:8

จุด	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		แสงอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร	แสงอัลตราไวโอเล็ต 366 นาโนเมตร	น้ำยาพ่น 5% วานิลลินในกรดกำมะถัน
1	16 - 20	-	-	ชมพู
2	23 - 25	ทึบแสง	-	เหลือง
3	30 - 33	-	-	ม่วง
4	48 - 50	ทึบแสง	ฟ้า	ม่วง
5*	51 - 55	ทึบแสง	เหลือง	เหลือง
6	60 - 61	-	ฟ้า	ชมพู
7	65 - 67	-	-	เทา
8	81 - 83	ทึบแสง	-	เขียว
9	86 - 89	-	ฟ้า	ชมพู
10	93 - 95	-	-	ม่วง
11	96 - 98	ทึบแสง	ฟ้า	ม่วง

*Colchicine

เมื่อนำสารสกัดตองตึงในเอทานอลไปทดสอบในน้ำยาแยก ชนิดที่ 2 ethyl-acetate: methanol: ammonium solution อัตราส่วน 85:10:5 แสดงแถบของสารที่ตำแหน่งเดียวกัน 16 แถบ มีค่า hR_f ในช่วง 6-8, 9-10, 11-12, 18-20, 21-23, 25-28, 30-35, 36-38, 45-50, 60-65, 70-75, 79-82, 83-85, 90-92, 93-94 และ 95-96 เมื่อเทียบกับสารสำคัญ คือ โคลชิซิน มีค่า hR_f ในช่วง 45-50 (ตารางที่ 2) ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะให้ผลทึบแสง เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ตัวอย่าง PMC01 (Authentic) จะเห็นการเรืองแสงสีฟ้าเล็กน้อย ส่วนตัวอย่าง PMC02 และ PMC03 (Authentic) ให้ผลเรืองแสงสีฟ้าชัดเจน และเมื่อพ่นด้วยสารละลาย 5% วานิลลินในกรดกำมะถัน แล้วนำไปให้ความร้อนจะให้แถบสีเหลือง (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากหัวตองตึงแห้ง โดยน้ำยาแยก ชนิดที่ 2 ส่วนผสมของ ethyl-acetate: methanol: ammonium solution อัตราส่วน 85:10:5

- 1 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC01 (authentic)
- 2 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC02 (authentic)
- 3 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC03 (authentic)
- 4 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC04
- 5 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC05
- 6 = สารมาตรฐานโคลชิซิน
- 7 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC06
- 8 = ตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งหมายเลข PMC07
- I = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
- II = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร
- III = ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟ่น 5% วานิลลินในกรดกำมะถันและให้ความร้อน 105 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 แสดงค่า hR_f ของสารสกัดจากหัวตองดึงแห้งโดยน้ำยาแยก ชนิดที่ 2 ส่วนผสมของ ethyl-acetate: methanol: ammonium solution อัตราส่วน 85 : 10 : 5

จุด	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		แสงอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร	แสงอัลตราไวโอเล็ต 366 นาโนเมตร	น้ำยาฟ่น 5% วานิลลินในกรดกำมะถัน
1	6 - 8	-	-	ชมพู
2	8 - 10	ทึบแสง	-	ม่วง
3	10 - 12	-	-	ชมพู
4	18 - 20	-	-	เทา
5	21 - 23	-	ฟ้า	ชมพู
6	25 - 28	ทึบแสง	-	ม่วง
7	30 - 35	ทึบแสง	-	เหลือง
8	36 - 38	-	ฟ้า	-
9*	45 - 50	ทึบแสง	ฟ้า	เหลือง
10	60 - 65	ทึบแสง	-	เทา
11	70 - 75	ทึบแสง	-	เทา
12	79 - 82	ทึบแสง	-	เขียว
13	83 - 85	ทึบแสง	-	ชมพู
14	90 - 92	-	ฟ้า	ชมพู
15	92 - 94	-	-	ม่วง
16	95 - 96	ทึบแสง	ฟ้า	ม่วง

*Colchicine

2. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

จากการทดสอบหาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลของตัวอย่างผงหัวตองดึงแห้งทั้ง 15 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดสอบ 2 ซ้ำ ผลการทดสอบคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของหัวตองดิงแห้ง

ตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น ความชื้น (% w/w)	ปริมาณ เถ้ารวม (% w/w)	ปริมาณเถ้า ที่ไม่ละลายในกรด (% w/w)	ปริมาณ สารสกัดด้วยน้ำ (% w/w)	ปริมาณ สารสกัด ด้วยเอทานอล (% w/w)
PMC 01 (นักพฤกษศาสตร์)	7.7798	3.6350	0.3897	26.4287	4.0991
PMC 02 (นักพฤกษศาสตร์)	7.7686	3.3228	0.1374	23.0428	0.8150
PMC 03 (นักพฤกษศาสตร์)	7.6555	2.7955	0.1399	22.8561	1.4199
PMC 04 ร้านค้าจากกรุงเทพฯ	8.9988	5.4134	1.7645	21.8535	2.7702
PMC 05 ร้านค้าจากนครสวรรค์	9.1608	8.5306 ^a	5.0989 ^a	19.9146	2.3049
PMC 06 ร้านค้าจากนครสวรรค์	9.1067	4.6536	1.0997	22.7634	4.2500
PMC 07 ร้านค้าจากอุทัยธานี	9.0576	3.4358	0.1049	19.9290	0.5100 ^a
PMC 08 ร้านค้าจากเชียงใหม่	8.6024	6.5475	2.5815	19.1790	4.0496
PMC 09 ร้านค้าจากเชียงใหม่	9.1922	4.0045	0.5949	18.8841	2.7996
PMC 10 ร้านค้าจากสงขลา	8.8839	4.8043	1.1142	21.5752	3.5245
PMC 11 ร้านค้าจากสุราษฎร์ธานี	8.9308	5.0591	1.3948	21.3246	3.0697
PMC 12 ร้านค้าจากนครราชสีมา	9.1447	4.2259	1.0796	22.0484	2.1449
PMC 13 ร้านค้าจากบุรีรัมย์	7.1204	3.3801	0.1324	16.9550	2.7749
PMC 14 ร้านค้าจากสระแก้ว	10.1523	7.1273	3.5187	18.9702	2.8148
PMC 15 ร้านค้าจากนครราชสีมา	9.6995	3.7368	0.3099	18.0650	2.5349
ค่าเฉลี่ย	8.7502	4.5651 ^b	1.0967 ^b	20.9193	2.7017 ^b
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.8238	1.2154	1.0305	2.4139	0.9270

^aค่า outlier จากการคำนวณด้วยวิธี boxplot^bค่าเฉลี่ยคำนวณจาก 10% Trimmed mean

จากข้อมูลนำไปกำหนดเกณฑ์มาตรฐานตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปริมาณที่ระบุไว้ว่า “ไม่มากกว่า” จะนำค่าเฉลี่ยที่ได้บวกด้วยค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ได้แก่ ปริมาณความชื้น เถ้ารวม และเถ้าไม่ละลายในกรด ส่วนปริมาณที่ระบุไว้ว่า “ไม่น้อยกว่า” จะนำค่าเฉลี่ยที่ได้ลบด้วยค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ได้แก่ ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอทานอล (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการประเมินข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของผงหัวตองดิงแห้ง

ประเภทของการทดสอบ (หน่วย)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน เฉลี่ย ($\bar{x} \pm SD$)	เกณฑ์กำหนด ค่าบน ($\bar{x} + SD$)	เกณฑ์กำหนด ค่าล่าง ($\bar{x} - SD$)
ปริมาณความชื้น (%w/w)	8.75 ± 0.82 a	9.57	-
ปริมาณเถ้ารวม (%w/w)	4.57 ± 1.22 b	5.79	-
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (%w/w)	1.10 ± 1.03 b	2.13	-
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (%w/w)	20.92 ± 2.41 a	-	18.51
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (%w/w)	2.70 ± 0.93 b	-	1.77

^an = 15^bn = 13 คำนวณจาก 10% Trimmed mean

ตารางที่ 5 ข้อสรุปคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงหัวตองตึง (โดยน้ำหนัก)

ประเภทของการทดสอบ (หน่วย)	ไม่มากกว่า	ไม่น้อยกว่า
ปริมาณความชื้น (%w/w)	10	–
ปริมาณเถ้ารวม (%w/w)	6	–
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (%w/w)	2	–
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (%w/w)	–	19
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (%w/w)	–	2

วิจารณ์

การศึกษาคุณภาพหัวตองตึงแห้งรวมทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างจำนวน 12 ตัวอย่าง ซื้อมาจากร้านขายยาแผนโบราณทุกภูมิภาคของประเทศไทย และตัวอย่างหัวตองตึงหัวจากแหล่งธรรมชาติผ่านการตรวจสอบชนิดพืชที่ถูกต้องตามหลักพฤกษศาสตร์โดยนักพฤกษศาสตร์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosa superba* Linn. วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นตัวอย่างแท้จริง (authentic) เพื่อใช้เปรียบเทียบผล จำนวน 3 ตัวอย่าง

การทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง เป็นข้อมูลของทั้ง 15 ตัวอย่าง แต่แสดงให้เห็นเพียง 7 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่าง Authentic 3 ตัวอย่าง (PMC 01 – PMC 03) ตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณ 4 ตัวอย่าง (PMC 04 – PMC 07) เพื่อให้สามารถเห็นแถบสารได้ชัดเจน การศึกษาโดยใช้ยาแยกชนิดที่ 1 benzene: ethyl-acetate: diethylamine: methanol ในอัตราส่วน 50:40:10:8 สามารถแยกแถบสารโคลชิซินออกจากสารอื่นได้ดีกว่า ชนิดที่ 2 ส่วนผสมของ ethyl-acetate: methanol: ammonium solution อัตราส่วน 85:10:5 ซึ่งจะเห็นได้จากโครมาโทแกรมตำแหน่งโคลชิซินค่า R_f ในช่วง 45–50 เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ของสารสกัด PMC 02 และ PMC 03 ควรเรืองแสงสีเหลืองกลับมีการเรืองแสงสีฟ้าเมื่อพ่นด้วยสารละลาย 5% วานิลีนในกรดกำมะถัน แล้วนำไปให้ความร้อน ก็จะทำให้แถบสีเหลือง เหมือนกับโคลชิซิน จึงเป็นไปได้ว่ามีสารสองชนิดอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ยังคงสามารถใช้ตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดตองตึงได้

การตรวจคุณภาพทางเคมีและกายภาพ โดยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล การตรวจปริมาณความชื้นในสมุนไพรมีความสำคัญต่อการเก็บและคุณภาพสมุนไพร เนื่องจากความชื้นจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หรือเชื้อราได้ง่าย เป็นเหตุให้สมุนไพรไม่ได้คุณภาพและเก็บได้ไม่นาน ซึ่งเป็นปัญหาของประเทศร้อนชื้นที่ต้องมีการกำหนดค่าความชื้นไว้สำหรับการตรวจปริมาณเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเป็นค่าที่บอกถึงการปนเปื้อนจากส่วนพืชที่ไม่ต้องการหรือทราย ซึ่งจะมีผลทำให้คุณภาพทางกายภาพและเคมีของสมุนไพรต่ำลง จึงได้มีการกำหนดค่าสูงสุดที่ยอมให้ตรวจพบได้ กำหนดเกณฑ์เป็นค่า “ไม่มากกว่า” ส่วนปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เป็นการบ่งชี้คุณภาพของสารสำคัญในผงสมุนไพรโดยเฉพาะเมื่อผงสมุนไพรนั้นยังไม่มีวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ จึงได้มีการกำหนดค่าต่ำสุดที่ยอมให้ตรวจพบได้ กำหนดเกณฑ์เป็นค่า “ไม่น้อยกว่า” ซึ่งผลของข้อกำหนดค่าทางเคมีและกายภาพที่ได้จากการทดสอบ (ตารางที่ 5) จะเห็นปริมาณเถ้ารวม และเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ซึ่งมีเกณฑ์กำหนดไม่มากกว่าร้อยละ 6 และ 2 โดยน้ำหนักนั้นใกล้เคียงกับค่าที่กำหนดไว้ในเภสัชตำรับมาตรฐานยาสมุนไพรของประเทศอินเดีย⁽⁸⁾ (ตารางที่ 6) ส่วนปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอทานอลไม่น้อยกว่าร้อยละ 19 และ 2 โดยน้ำหนักค่อนข้างแตกต่างจากเกณฑ์ของเภสัชตำรับมาตรฐานยาสมุนไพรของประเทศอินเดีย ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนการนำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยแห้งใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ เภสัชตำรับมาตรฐานยาสมุนไพรของประเทศไทยให้ใช้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ส่วนการวิจัยนี้ใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ข้อกำหนดทางเคมีของหัวตองตึงแห้งในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรของประเทศอินเดีย

ประเภทของการทดสอบ (หน่วย)	ไม่มากกว่า	ไม่น้อยกว่า
ปริมาณความชื้น (% w/w)	-	-
ปริมาณเถ้ารวม (% w/w)	6	-
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (% w/w)	1	-
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% w/w)	-	15
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (% w/w)	-	5

ผลจากการศึกษาวิจัยนี้ทำให้สามารถจัดทำข้อกำหนดคุณภาพเบื้องต้นของสมุนไพรหัวตองตึง และมีความจำเป็นอย่างมากในการควบคุมคุณภาพในเรื่องปริมาณสารในสมุนไพรเนื่องจากสารสำคัญโคลชิซินที่พบมีสรรพคุณในการรักษาโรค แต่ก็มีรายงานความเป็นพิษด้วย⁽³⁾ ดังนั้น จึงเห็นควรดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญโคลชิซินในสมุนไพรตองตึงเพื่อใช้ในการกำหนดค่ามาตรฐานต่อไป

สรุป

ตัวอย่างหัวตองตึงแห้งที่นำมาศึกษาทั้ง 15 ตัวอย่าง จากการตรวจเอกลักษณ์ด้วยน้ำยาแยก สามารถตรวจพบสารสำคัญโคลชิซินในทุกตัวอย่าง และจากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ สรุปได้ว่าหัวตองตึงแห้งควรมีค่ามาตรฐานทางเคมีและกายภาพ ดังนี้

ปริมาณความชื้น ไม่มากกว่า	10.0%	โดยน้ำหนัก
ปริมาณเถ้ารวมไม่มากกว่า	6.0%	โดยน้ำหนัก
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดไม่มากกว่า	2.0%	โดยน้ำหนัก
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำไม่น้อยกว่า	19.0%	โดยน้ำหนัก
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ไม่น้อยกว่า	2.0%	โดยน้ำหนัก

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักจัดการความรู้และเทคโนโลยีวิทยาศาสตร์การแพทย์ การฝึกอบรมเทคนิคการทดสอบตามข้อกำหนดมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยจากสถาบันวิจัยสมุนไพร วิทยาลัยการแพทย์ และขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ เกษัชกรหญิงปราณี ขวลิตรำรง หัวหน้าโครงการ รวมทั้งเครือข่ายนักวิจัยภายใต้โครงการพัฒนาศักยภาพของสมุนไพรที่มีการใช้ในท้องถิ่นทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและร่วมกันแก้ไขปัญหา ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จตามวัตถุประสงค์

กิตติกรรมประกาศ

1. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ตองตึง. [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 กรกฎาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=43>
2. Jana S, Shekhawat GS. Critical review on medicinally potent plant species: *Gloriosa superba*. *Fito-terapia* 2011; 82(3): 293-301.

3. McEvoy GK, edited. AHFS drug information. Bethesda, MD.: American Society of Health-System Pharmacists; 1999. p.3234-3236
4. ชุนโสภิต บรรณลักษณ์. คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ เล่ม 2. [ออนไลน์]. 2558. [สืบค้น 29 กรกฎาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก : <https://be7herb.wordpress.com>
5. ชุนโสภิต บรรณลักษณ์. คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ เล่ม 3. [ออนไลน์]. 2558. [สืบค้น 29 กรกฎาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก : URL: <https://be7herb.wordpress.com/คัมภีร์แพทย์-ตำรายา/คัมภีร์แพทย์/คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ/>
6. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia Vol. I. 2nd ed. Appendices 4.15 Loss on drying. Bangkok: Prachachon; 1998. p. 123-4.
7. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia Vol. II. 2nd ed. Appendices 7.6 Acid-insoluble Ash, 7.7 Total Ash and 7.12 Extractives. Bangkok: Prachachon; 2000. p. 108, 141.
8. Government of India Ministry of Health and Family Welfare Department of ISM & H. The Ayurvedic Pharmacopoeia of India Part I, Volume III. Page 106-107. [Cited 2015 July 29]. Available from: URL: <http://www.ayurveda.hu/api/API-Vol-3.pdf>

Quality Study of Dried Dong-Dueng Tuber (*Gloriosa superba* Linn.)

Tassanee Panphadung Saijai Pariyawatee Sayan Koonnoot
and Narumon Boonrasri

Regional Medical Sciences Center 12th Songkhla, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang,
Songkhla 90000 Thailand.

ABSTRACT *Gloriosa superba* Linn. or as called Dong-Dueng, belongs to Family Liliaceae. This herb has been used as analgesic for acute inflammatory disease of joints in Thai traditional medicine. Colchicine is reported as the active ingredient of Dong-Dueng. There is no standard specification of Dong-Dueng in Thai Herbal Pharmacopoeia yet. The main objective of this study is to provide scientific information to establish the standard requirements for chemical characteristics. Fifteen samples of crude drug were collected from natural sources and purchased from traditional drugstore in Thailand. It was found that the contents of water-soluble extractive, ethanol-soluble extractive, moisture content, total ash content and acid-insoluble ash content were 20.92 ± 2.41 , 2.70 ± 0.93 , 8.75 ± 0.82 , 4.57 ± 1.22 และ $1.10 \pm 1.03\%$ w/w, respectively. Chemical identification of these crude drug by thin-layer chromatography was also reported. The results of these study will be useful for the quality control of Dong-Dueng and preparation of Thai Herbal Pharmacopoeia.

Key words: *Gloriosa superba* Linn., Physico-chemical quality

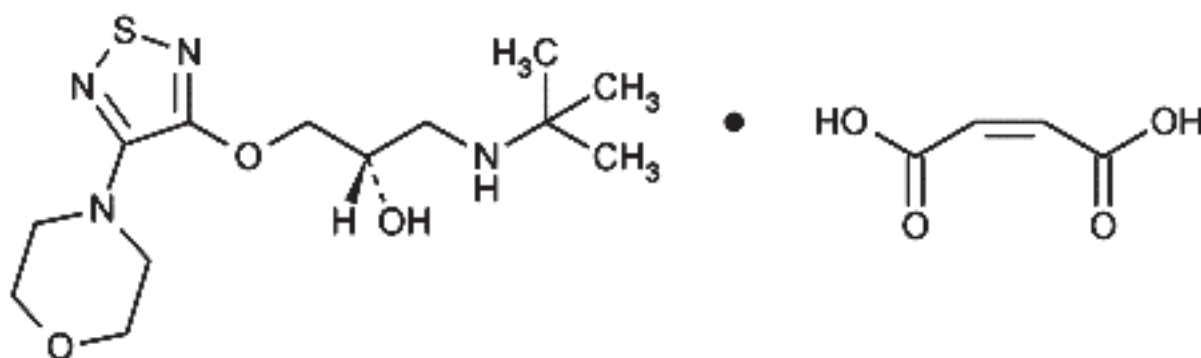
นพ.นันท วงศ์นาทิจเจริญกุล กุลธิดา อำพันธ์ทอง และบรรจง กิติรัตนตระกูล
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาโทโมลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา เพื่อให้ใช้ได้กับเครื่องอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี พร้อมทั้งทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้คอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 $\times$ 100 mm ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีสัดส่วนตัวพา ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเมทานอล คือ 65 : 35 อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะต่อการหาปริมาณตัวยาโทโมลอล มาลีเอต ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.056–0.423 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9999 การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ พบว่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 98.2 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.5 การทดสอบความเที่ยงภายในวันเดียวกันมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.4 และต่างวันกันมีค่าเท่ากับ 1.3 วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ใช้ทดสอบ คือ การเปลี่ยนสัดส่วนของสารละลายตัวพา และการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาหยอดตาโทโมลอล มาลีเอต จำนวน 15 ตัวอย่างที่ส่งจากโรงพยาบาลของรัฐในประเทศไทย ตรวจวิเคราะห์หวัหข้อการตรวจเอกลักษณ์ การตรวจปริมาณตัวยาสำคัญ ค่าความเป็นกรด-เบส และการทดสอบความปราศจากเชื้อ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐาน

บทนำ

ในปัจจุบันต้อหินเป็นสาเหตุอันดับแรกๆ ที่นำไปสู่การตาบอด (irreversible blindness) ของประชากร โดยทำให้เกิดการตายของเซลล์และใยประสาทตา โรคต้อหินมักพบในผู้สูงอายุ และมีจำนวนผู้ป่วยมากขึ้นเรื่อยๆ⁽¹⁾ ทิโมลอลเป็นยาในกลุ่ม non-selective beta-adrenergic receptor antagonist ในประเทศไทยขึ้นทะเบียนเป็นยาหยอดตาในรูปเกลือของทิโมลอล มาลีเอต ออกฤทธิ์ลดความดันลูกตาในผู้ป่วยโรคต้อหินที่มีความดันลูกตาสูง ยาหยอดตาทิโมลอล มาลีเอต (Timolol maleate eye drop) เป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556 กลุ่ม 11.4 Drugs for treatment of glaucoma จัดอยู่ในบัญชี ก⁽²⁾ ยาหยอดตาทิโมลอล มาลีเอต ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย เฉพาะสูตรยาเดียวที่เป็นยาแผนปัจจุบันสำหรับมนุษย์ มี 18 เลขทะเบียน โดยเป็นผู้ผลิตในประเทศไทย 14 เลขทะเบียน และเป็นผู้ผลิตต่างประเทศ 4 เลขทะเบียน⁽³⁾

ทิโมลอล มาลีเอต มีลักษณะเป็นผงสีขาวละลายได้ในน้ำ และเอทานอล มีชื่อทางเคมี คือ (2S)-1-[(1,1-Dimethylethyl) amino]-3-[[4-(morpholin-4-yl)-1,2,5-thiadiazol-3-yl]oxy]propan-2-ol(Z)-butenedioate.⁽⁴⁾ มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 432.49 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี⁽⁵⁾ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของทิโมลอล มาลีเอต

การวิเคราะห์ปริมาณตัวยาทิโมลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา ที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP36) ใช้วิธี High-performance Liquid Chromatography (HPLC) คอลัมน์ ขนาด 4.6 mm. × 15 cm. บรรจุอนุภาค L1 ขนาด 5 micron ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส ใช้สารละลายตัวพา คือ phosphate buffer pH 2.8 และเมทานอล ในสัดส่วน 2:1 อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร⁽⁶⁾

เนื่องจากในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องมือแยกสาร Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC) ที่ใช้หลักการเดียวกันกับ HPLC แต่มีประสิทธิภาพการแยกสารที่ดีกว่า สามารถทนแรงดันได้มากกว่า ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กกว่า จึงใช้ระยะเวลาและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาทิโมลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา เพื่อให้ใช้ได้กับ UPLC พร้อมทั้งทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์⁽⁷⁾ ตามหลักเกณฑ์ของ USP⁽⁸⁾ และ ICH Guideline⁽⁹⁾ เพื่อใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในการตรวจคุณภาพยาหยอดตาทิโมลอล มาลีเอต

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต ความแรง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 ตัวอย่าง สุ่มจากโรงพยาบาลของรัฐในประเทศไทย ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม 2557 ถึง 8 ธันวาคม 2557

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : monobasic sodium phosphate, phosphoric acid, methanol HPLC grade, acetonitrile HPLC grade, น้ำ HPLC grade จากเครื่อง ELGA Purelab Maxima

สารมาตรฐาน : USP Timolol Maleate RS

วิธีการทดสอบ มี 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ โดยการละลาย monobasic sodium phosphate 11.1 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้อยู่ในช่วง pH 2.8 ± 0.05 ด้วยกรด phosphoric acid
2. การเตรียมสารละลาย **Diluent** ผสม acetonitrile และสารละลายบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 2 : 1
3. การเตรียมสารละลายตัวพา ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ และเมทานอล ในอัตราส่วน 65 : 35
4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ซึ่งสารมาตรฐาน USP Timolol Maleate RS 34 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.056, 0.113, 0.141, 0.169, 0.282 และ 0.423 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ละลายตัวอย่างเทียบเท่า ทีโมลอล 5 มิลลิกรัม ในสารละลาย Diluent 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เครื่องมือ และอุปกรณ์ เครื่อง UPLC: Waters Model H-class ประกอบด้วย Quaternary solvent manager, Sample manager FTN, Column Heater Compartment และ PDA e λ Detector ส่วนควบคุมและประมวลผลโดย Empower Software คอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm

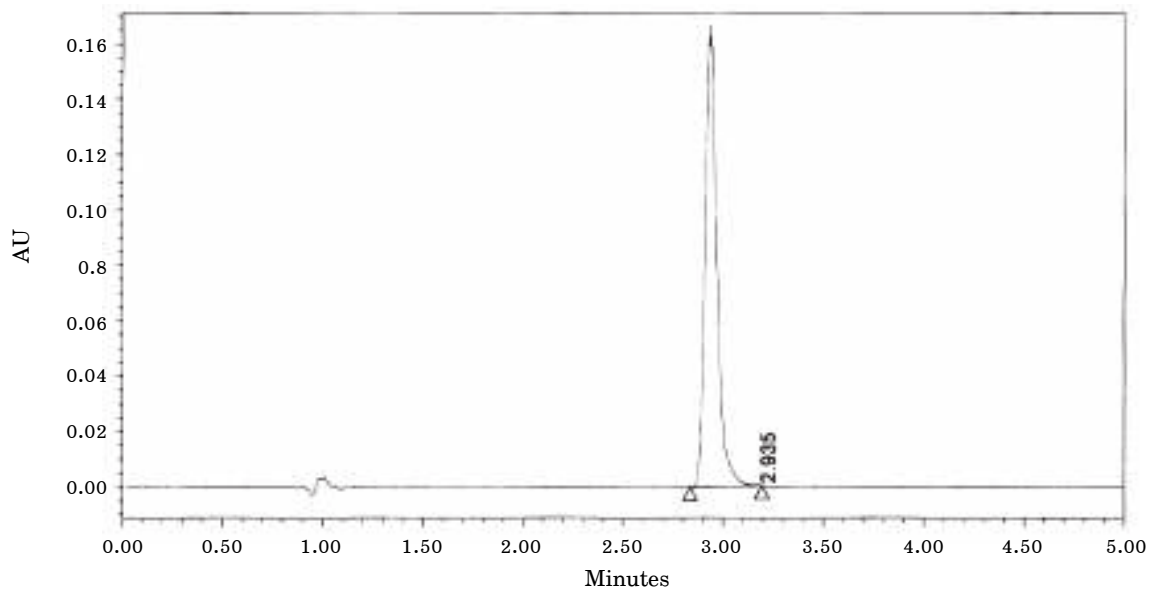
สภาวะที่ใช้ทดสอบ จิตสารละลาย 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง UPLC โดยใช้คอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีสัดส่วนตัวพา Phosphate buffer และเมทานอล คือ 65 : 35 อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (**Method Validation**) ทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ USP⁽⁸⁾ และ ICH Guideline⁽⁹⁾ ในหัวข้อการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity), การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995, การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) โดยการคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ต้องอยู่ในช่วง 95-105%, การทดสอบความเที่ยง (Precision) โดยการคำนวณ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำต้องไม่มากกว่า 2.0 และการทดสอบความทนของวิธี (Robustness) โดยการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ แล้วคำนวณค่า %RSD ต้องไม่มากกว่า 2.0

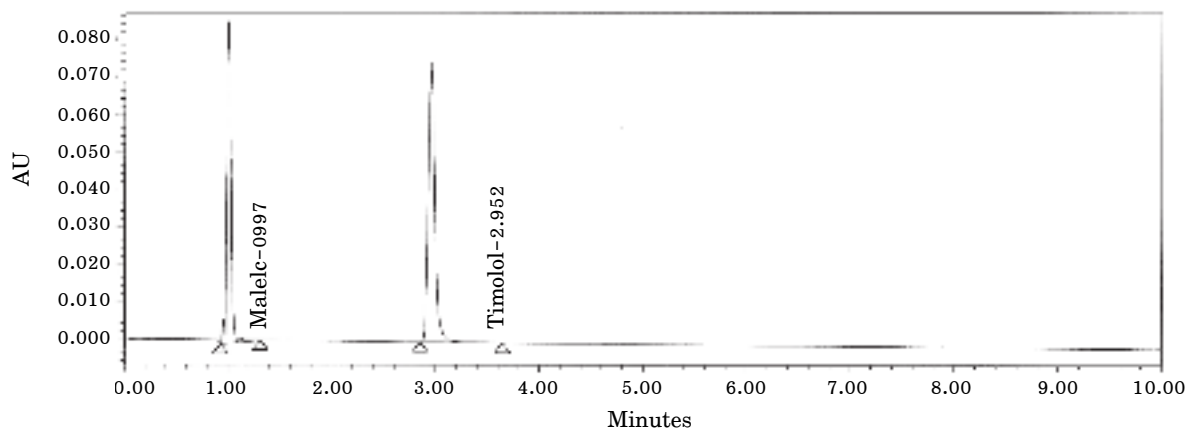
ผล

จากการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) โดยนำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC เปรียบเทียบโครมาโทแกรม (Chromatogram) ของสารละลายตัวอย่าง เทียบกับ

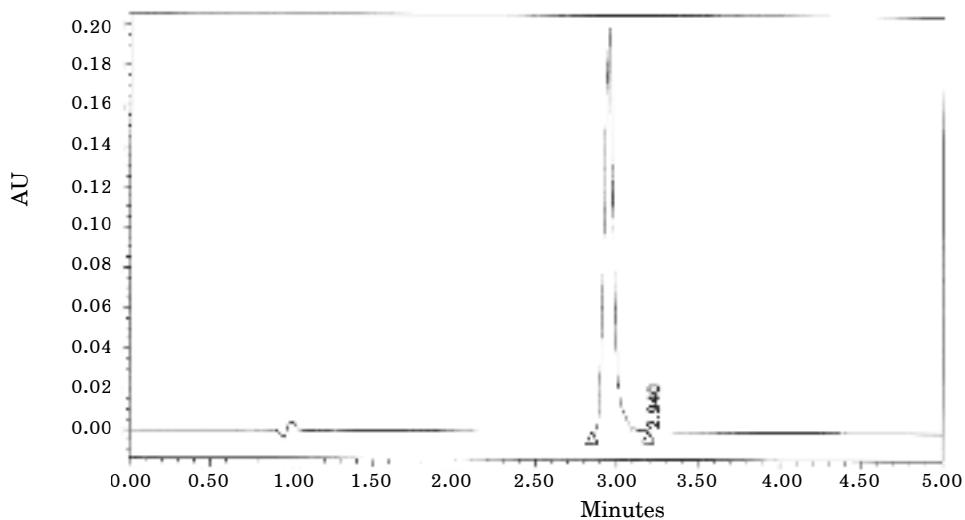
โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน พบว่าสภาวะที่ทดสอบสามารถแยกพีคของ Timolol maleate และ Maleic acid ออกจากกันได้ และไม่มีพีครบกวนการวิเคราะห์ (ภาพที่ 2, 3, 4 และ 5)



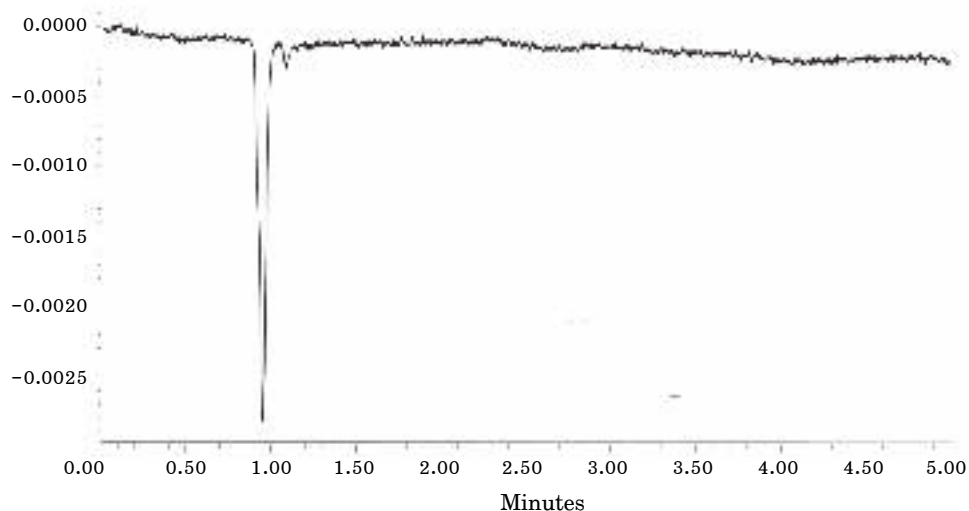
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารละลายผสม Timolol maleate และ Maleic acid

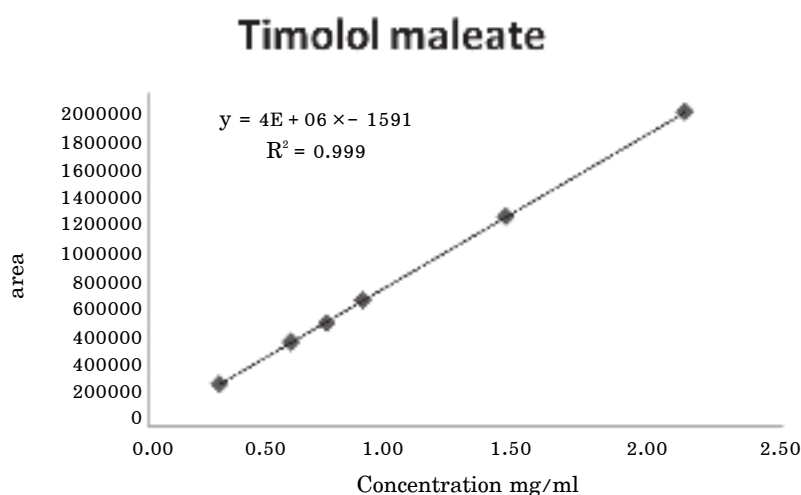


ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของ Blank

ในการทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range) ด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0.056, 0.113, 0.141, 0.169, 0.282 และ 0.423 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีค พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดล้นใจเท่ากับ 0.9999 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค

ส่วนการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับ ความเข้มข้น คือ 0.113, 0.141 และ 0.169 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว พบค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) เท่ากับ 97.8, 98.2 และ 98.7 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบร้อยละของการคืนกลับ

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย
80%	0.113	97.8
100%	0.141	98.2
120%	0.169	98.7
เฉลี่ย		98.2
%RSD		0.5

การทดสอบความเที่ยง (Precision) ในส่วนของผลการทดสอบการทำซ้ำได้ (Repeatability) ด้วยการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ ในวันเดียวกันมี %RSD เท่ากับ 0.4 ส่วนการวิเคราะห์ต่างวันกันจำนวน 3 วัน (Intermediate Precision) มี %RSD เท่ากับ 1.3 (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Repeatability

ครั้งที่	ความเข้มข้น (mg/ml)
1	0.1478
2	0.1483
3	0.1480
4	0.1483
5	0.1496
6	0.1480
เฉลี่ย	0.148
%RSD	0.42

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Intermediate Precision

ครั้งที่	ความเข้มข้น (mg/ml)
1	0.148
2	0.148
3	0.152
เฉลี่ย	0.149
%RSD	1.25

สำหรับการทดสอบความทนของวิธี (Robustness) โดยทดลองเปลี่ยนสภาวะของระบบ UPLC โดยการเปลี่ยนสัดส่วนของสารละลายตัวพาสเฟออร์ และเมทานอล เป็น 55 : 45 และเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 30 และ 35 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ พบว่า %RSD เท่ากับ 1.0 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Robustness

สภาวะที่ทดสอบ	ความเข้มข้นเฉลี่ย
สัดส่วนสารละลาย 55 : 45	0.149
อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส	0.150
อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส	0.152
อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส	0.148

หลังจากนั้นได้นำวิธีการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์การทดสอบความถูกต้องของวิธีมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างยาหยอดตาทิโมลอล มาลีเอต โดยการสุ่มตัวอย่างยาหยอดตาทิโมลอล มาลีเอต จากโรงพยาบาลของรัฐ ภายในช่วงเวลาเดือนตุลาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2557 จำนวน 15 ตัวอย่าง 5 ทะเบียนยา/ผู้ผลิต โดยมีหัวข้อการตรวจสอบคุณภาพยาและเกณฑ์มาตรฐานตาม USP 36 พบว่า ตัวอย่างที่สุ่มมาทั้งหมด ร้อยละ 100 มีคุณภาพเข้ามาตรฐาน USP 36 ทุกหัวข้อการวิเคราะห์ (ตารางที่ 5 และ 6)

ตารางที่ 5 หัวข้อการตรวจสอบคุณภาพยา และเกณฑ์มาตรฐานตาม USP 36

หัวข้อตรวจสอบคุณภาพ	เกณฑ์มาตรฐาน
การตรวจเอกลักษณ์ (Identification)	ตรวจพบ Timolol Maleate
ปริมาณตัวยาสำคัญ (Active Ingredient)	90.0 – 110.0 % LA
ค่าความเป็นกรด-เบส (pH)	6.5 – 7.5
การทดสอบความปราศจากเชื้อ (Sterility Test)	Sterile

ตารางที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาหยอดตาทิโมลอล มาลีเอต

ประเทศ	ทะเบียนยา/ผู้ผลิต	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนรุ่นการผลิต	ผลวิเคราะห์
ไทย	ก	4	4	เข้ามาตรฐาน
อินเดีย	ข	3	3	เข้ามาตรฐาน
ไทย	ค	2	1	เข้ามาตรฐาน
เบลเยียม	ง	3	2	เข้ามาตรฐาน
ไทย	จ	3	3	เข้ามาตรฐาน
รวม		15	13	

วิจารณ์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาทิโมลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา ด้วยวิธี UPLC พบว่า วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากการทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9999 ซึ่งมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995 จึงถือว่าผ่านเกณฑ์กำหนด

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 80, 100 และ 120% ของความเข้มข้นที่ใช้ผลวิเคราะห์ทั้ง 3 ระดับ อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับคือ 95–105% อย่างไรก็ตาม ผลของการทดสอบร้อยละของ

การคืนกลับที่ได้ไม่เป็น normal curve อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพของเครื่องมือ หรือวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งควรมีการวิเคราะห์สาเหตุที่แน่นอน เพื่อนำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ดีขึ้นต่อไป

การทดสอบความเที่ยงของวิธี พบว่า %RSD ของการทำซ้ำ เท่ากับ 0.4 และ %RSD ของการวิเคราะห์ต่างวัน เท่ากับ 1.3 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ ไม่มากกว่า 2.0

สำหรับการทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการวิเคราะห์ พบว่า %RSD เท่ากับ 1.0 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ ไม่มากกว่า 2.0

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามหัวข้อต่าง ๆ ดังกล่าว จึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา timolol maleate ในยาหยอดตาได้ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ใช้สารเคมีปริมาณน้อยทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

การศึกษาคุณภาพยาหยอดตา timolol maleate พบว่า ตัวอย่างที่สุ่มได้จากโรงพยาบาลของรัฐบาล มีจำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง จากผู้ผลิตจำนวน 5 ราย ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อ ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification) การหาปริมาณตัวยาสำคัญ (Active ingredient) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความปราศจากเชื้อ (Sterility Test) พบว่า ตัวอย่างทั้งหมด ร้อยละ 100 ผ่านเกณฑ์ที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP36) ทุกหัวข้อการวิเคราะห์ จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างยาหยอดตา timolol maleate ที่ถูกสุ่มทั้งหมดมีคุณภาพตามมาตรฐานสากล

สรุป

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา timolol maleate ในยาหยอดตาได้ และตัวอย่างยาหยอดตา timolol maleate ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ทุกตัวอย่างมีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางจิตรารัตน์ ปลื้มใจ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา และนางสาวสุรชนี เสวตศิลา ผู้อำนวยการสำนักยาและวัตถุเสพติด ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

1. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014; 121(11): 2081-90.
2. คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556. นนทบุรี: สำนักยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2556.
3. งานบริการข้อมูลผลิตภัณฑ์สุขภาพผ่านอินเทอร์เน็ต. ผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 พ.ค. 2557]; เข้าถึงได้จาก : URL: <http://fdaolap.fda.moph.go.th/logistics/drgdrug/DSerch.asp>.
4. Timolol maleate. In: British pharmacopeia 2013. London: The Stationary Office; 2012. p. 2162-2164.
5. Timolol maleate. In: United States pharmacopeia 36 - national formulary 31. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 5400.
6. Timolol maleate ophthalmic solution. In: United States pharmacopeia 36 - national formulary 31. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 5401.

7. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
 8. Validation of compendial procedures. In: United States pharmacopeia 36 – national formulary 31. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 983–987.
 9. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). Geneva: ICH Secretariat; 2005.
-

UPLC Method Development and Validation for Determination of Timolol Maleate in Ophthalmic Solution

Napanan Wongthanakitcharoen Kulthida Ampantong and Banjong Kitirattrakran

*Regional medical sciences Center 9 Nakhonratchasima, Department of Medical Sciences Amphoe
Muang, Nakhonratchasima 30000, Thailand*

ABSTRACT The method validation for determination of Timolol Maleate in ophthalmic preparation was established using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). The separation was achieved on a Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm at 40 degree Celsius. The mobile phase was the mixture of phosphate buffer and methanol (65:35) at the flow rate of 0.25 ml per minute with UV detection at 295 nm. Specificity test showed that Timolol maleate peak was not interfered by other peak. The linearity test showed linear relationship between the area under the peak and concentration levels in range of 0.056 to 0.423 mg per ml with coefficient of determination 0.9999. The percentage mean recovery from 3 concentration levels was 98.2 (%RSD = 0.5). The precision test within same day gave %RSD of 0.4 and different days gave %RSD of 1.3. The robustness test indicate that describe method was robust when the chromatographic condition were changed such as composition and column temperature. The quality of Timolol Maleate eye drop 15 samples were sampling from government hospitals in Thailand. The samples were analyzed for identification test, assay of active ingredient, pH and sterility test. All samples passed the specifications.

Key words : Timolol, UPLC

ดัชนีชื่อผู้พิมพ์ ว กรรมวิทย์ พ 58 (1-4) 2559

ก		ท	
กนกชน สุภาพรหม	58:3:189-197	ทัศนีย์ ปานผดุง	58:4:270-282
กนกพรรณ สมบูรณ์ทรัพย์	58:2:80-92	ทิฆัมพร แย้มสะอาด	58:2:130-140
กมลวรรณ กันแต่่ง	58:3:189-197		
กอบบุญ บุญเย็น	58:1:17-32		
กิงกาญ ทองงาม	58:2:130-140	ธำรงค์ ผลชีวิน	58:3:161-168
กุลธิดา อำพันธ์ทอง	58:4:283-292	ธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์	58:3:169-179
		ธีรวัฒน์ สุภาวัฒน์พันธ์	58:2:120-129
จ		น	
จำเรียง ปุญญะประสิทธิ์	58:1:39-48		
จินดา ทองเรือง	58:2:73-79	นพนันท์ วงศ์ธนาภิจักริญา	58:4:283-292
	58:3:141-148	นพดล เปี่ยมศิริ	58:4:221-228
จิรเดช ปัจฉิม	58:3:149-160	นวลพรรณ ไพบูลย์ศรีนคร	58:1:1-17
จุไร โชติชนาทวีวงศ์	58:4:246-251		58:2:108-119
		นันทนา กลิ่นสุนทร	58:1:1-17
		นฤมล บุญราศรี	58:2:270-282
ข		บ	
ชมโฉไล สันธสาร	58:4:246-25		
ชมพูนุท นุตสถาปนา	58:3:208-220		
ชวลิต เกียรติวิษณุกุล	58:1:49-60	บงกช พันธุ์บูรณานนท์	58:3:208-220
		บรรจง กิตติรัตน์ตระกูล	58:4:283-292
ณ		ป	
ณปภา สิริศุภกฤตกุล	58:3:208-220		
ณัฐกานต์ ดิยศิwap	58:1:39-48	ปนัดดา เทพอัศศร	58:4:257-269
ณัฐพัชร รัตนเดชาเนคินทร	58:4:221-228	พรทิพย์ ไชยยะ	58:1:49-60
			58:4:257-269
ด		ม	
ดวงดาว วงศ์สมมาตร	58:3:197-207		
ดวงรัตน์ จุลอักษร	58:4:257-269	มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์	58:2:130-140
ดุจดาว บุญยอด	58:1:49-60		
	58:4:221-228		
ด		ย	
		เยาวลักษณ์ วรรณนะพิศิษฐ์	58:1:17-32
ต		ร	
ดวงพร เข้มทอง	58:1:1-17		
เต็มสิริ เคนคำ	58:1:61-71		

รัชฎาพร สุวรรณรัตน์	58:3:197-207	สายใจ ปรีะวาที	58:4:270-282
เรวดี สิริธัญญานนท์	58:4:246-251	สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์	58:3:169-179
		สายัน ขุนนุช	58:4:270-282
ล		สิริชัย เขียวรัตน์กุล	58:3:141-148
ลดาวัลย์ จิงสมานกุล	58:3:189-197	สิรินทรนิชา สีมาชัยสิน	58:4:229-245
โลมไสล วงศ์จันตา	58:1:61-71	สุกัลยาณี ไชยมี	58:3:149-160
		สุทัศน์ย์ วิมลเศรษฐ	58:2:120-129
ว		สุนัยนา สท้านไตรภพ	58:3:161-168
วาสิฏฐี แก้วกระจ่าง	58:4:246-251	สุพรรณ แสงสว	58:4:229-245
วิชชุดา จริยะพันธุ์	58:3:169-179	สุภาศิ สมุญจจินันท์	58:3:180-189
วิมลณี คงสุข	58:1:17-32	สุภาพร ภูมิอมร	58:3:149-160
วีรชัย ดิสนวัฒน์	58:3:141-148	สุนนา ศิริสุนทร	58:1:17-32
		อ	
ศ		อณิชา เลื่องชัยแขวง	58:4:257-269
ศรวิรรณา หัตถยานานนท์	58:2:80-92	อโณทัย ศรีตนไชย	58:4:221-228
ศศิตา อยู่สุข	58:1:17-32	อนงค์ สิงการวไชย	58:1:33-38
ศศิธร ฐิติเพชรกุล	58:2:80-92	อโณทัย ศรีตนไชย	58:1:49-60
ศิริชัย สัญญะ	58:4:229-245	อภิชัย ประชาสุภาพ	58:4:257-269
ศิริพร ทองประกายแสง	58:2:93-107	อรุณรัตน์ ปัตถาทุม	58:3:180-189
		อัจฉรา อยู่คง	58:3:189-197
ส		อัชฌา สัจจาปะละ	58:1:39-48
สกุลรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์	58:4:257-269	อำนาจ บุญเครือพันธุ์	58:3:161-168
สมชาย แสงกิจพร	58:2:130-140	อุดมเกียรติ พรพรรณประเทศ	58:2:120-129
	58:3:161-168	อุมาวดี สังข์ทอง	58:3:180-189
สมปอง ทรัพย์สุทธินาสน์	58:3:149-160		

AUTHOR INDEX

Bull Dept Med Sci 58 (1-4) 2016

A		L	
Anicha Liengchaichaweng	58 : 4 : 221-228	Ladawan Chungsamakool	58 : 3 : 189-197
Anothai Sritonchai	58 : 4 : 252-269	Lomsalai Wongchanta	58 : 1 : 61-71
Apichai Prachasuphap	58 : 4 : 252-269		
C		M	
Chamrieng Poonyaprasit	58 : 1 : 39-49	Maskiet Boonyareth	58 : 2 : 130-140
Chavalit Kiatvitchukul	58 : 1 : 49-60		
Chinda Tongruang	58 : 3 : 141-148		
	58 : 2 : 73-79		
Chomchailai Sinthusarn	58 : 4 : 246-251		
Chompoonut Nutsathapana	58 : 3 : 208-220		
D		N	
Duangdao Wongsommart	58 : 3 : 197-207	Nantana Klinsunthorn	58 : 1 : 1-16
Duangrat Jullakson	58 : 4 : 252-269		58 : 2 : 108-119
Dujdao Boonyod	58 : 1 : 49-60	Napanan Wongthanakitcharoen	58 : 4 : 283-292
	58 : 4 : 221-228	Napapha Sirisupakritkul	58 : 3 : 208-220
		Narumon Boonrasri	58 : 4 : 270-282
		Natthaphat Ratanadachanakin	58 : 4 : 221-228
		Noppadol Piamsiri	58 : 4 : 221-228
		Nuanpan Paiboonsrinakra	58 : 1 : 1-16
			58 : 2 : 108-119
		Nutthakan Tiyaawaporn	58 : 1 : 39-49
G		P	
Gobboon Boonyen	58 : 1 : 17-33	Panadda Dhepakson	58 : 4 : 252-269
		Porntip Chaiya	58 : 4 : 252-269
		Porntip Luppanakul	58 : 1 : 49-60
J		R	
Jiradej Patchim	58 : 3 : 149-160		
Jurai Chotichanathawewong	58 : 4 : 246-251		
K		S	
Kamonwan Kantaeng	58 : 3 : 189-197	Saijai pariyawatee	58 : 4 : 270-282
Kanitta Phuwanartnaranubarn	58 : 3 : 169-179	Saiwarul Jadoonkittinan	58 : 3 : 169-179
Kanothon Cupaprom	58 : 3 : 189-197	Sakulrat Soonthornchatrawat	58 : 4 : 252-269
Kanokpan Somyoonsup	58 : 2 : 80-92	Sasida Yoosook	58 : 1 : 17-33
Kingkan Tobngam	58 : 2 : 130-140	Sasithorn Thitipetchrakul	58 : 2 : 80-92
Kulthida Ampantong	58 : 4 : 283-292	Sayan koonnoot	58 : 4 : 270-282

Sirichai Theirrattanakul	58:3:141-148		T
Sirichai Sunya	58:4:229-245	Tassanee Panphadung	58:4:270-282
Sirinnicha Seemachaisin	58:4:229-245	Teerawat Supawatanapun	58:2:120-129
Siriporn Thongprakaisang	58:2:93-107	Temsiri Kenkum	58:1:61-71
Somchai Sangkitporn	58:2:130-140	Thicomporn Yamsaard	58:2:130-140
	58:3:161-168	Thumrong Phonchevin	58:3:161-168
Sompong Sapsutthipas	58:3:149-160	Tuangpon Khemthong	58:1:1-16
Sriwanna Hatayananont	58:2:80-92		
Sukanlayanee Chimee	58:3:149-160		U
Sumana Sirisoonthorn	58:1:17-33	Udomkiat Puntanaprated	58:2:120-129
Sunaiyana Sathantriphop	58:3:161-168		
Supakee Sayumpoorujinan	58:3:180-189		W
Supaporn Phumiamorn	58:3:149-160	Wasittee Kaewkrajang	58:4:246-251
Supat Sangsuay	58:4:229-245	Wichuda Jariyapan	58:3:169-179
Sutudsanee Vimolsarte	58:2:120-129	Witinee Kongsuk	58:1:17-33
			Y
		Yaowalak Wattanapisit	58:1:17-33

ดัชนีชื่อเรื่อง

ว กรมวิทย พ 58 (1-4) 2559

ก		การสำรวจการปนเปื้อน	
การตรวจพิสูจน์และยืนยัน	58 : 3 : 208-220	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonellae</i>	
เอกลักษณ์ยานอนหลับ		และ <i>E.coli</i> O157: H7	
ชนิดใหม่ ฟีนาลิแอม		ในเนื้อสัตว์ดิบที่จำหน่ายในตลาดสด	
ที่มีการใช้ในทางที่ผิดในประเทศไทย		เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล	
การตรวจวิเคราะห์สาร	58 : 2 : 93-107	การประเมินประสิทธิภาพ	58 : 4 : 221-228
กลุ่มพทาเลท (Phthalates)		เครื่องมือเหวี่ยงชนิด	
ในผลิตภัณฑ์สุขภาพโดยวิธี UPLC/DAD		Microhematocrit centrifuge	
การตรวจหาไวรัสโนโรในเนื้อ	58 : 1 : 39-48	ของหน่วยบริการ ปฐมภูมิ ในจังหวัดพิษณุโลก	
หอยนางรมดิบโดยวิธี		การแผ้วรัง <i>Vibrio</i>	58 : 2 : 80-92
real time Reverse		<i>parahaemolyticus</i> , <i>Staphylococcus</i>	
Transcription-Polymerase		<i>aureus</i> และ <i>Salmonella</i> spp.	
Chain Reaction (real time RT-PCR)		ในเนื้อปูต้มแกะ	
การตรวจหาสารพันธุกรรม	58 : 3 : 149-160	การพัฒนาระบบการจัดการ	58 : 1 : 61-71
ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero		เอกสารคุณภาพ	
ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัส		การพัฒนาระบบคุณภาพ	58 : 2 : 120-129
โดยวิธี Real-time Polymerase		มาตรฐานเครือข่ายห้องปฏิบัติการ	
Chain Reaction		ด้านการแพทย์และสาธารณสุข	
การทดสอบการระคายเคือง	58 : 2 : 130-140	เขตสุขภาพที่ 7	
เบื้องต้นของผลิตภัณฑ์		การพัฒนาระบบคุณภาพ	58 : 1 : 49-60
สุขภาพต่อผิวหนังสัตว์ทดลอง		ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์	
การทดสอบความถูกต้องของ	58 : 3 : 169-179	โรงพยาบาลในเขตสุขภาพที่ 2	
วิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรง		สู่มาตรฐานสากล ISO 15189	
ของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจาก		การพัฒนาระบบรับรองคุณภาพ	58 : 4 : 246-256
มนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก		ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์	
ด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป		ตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข	
การปนเปื้อนเชื้อโรคอาหาร	58 : 3 : 197-207	การพัฒนาและการทดสอบ	58 : 4 : 229-245
เป็นพิษในเนื้อสัตว์ดิบ		ความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม	
ที่จำหน่ายในตลาดสด		ไดออกซิน สารกลุ่มพีซีบีคล้าย	
เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล		ไดออกซิน และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้าย	
การประเมินความสามารถ	58 : 3 : 189-197	ไดออกซิน ในนมผงโดย HRGC/HRMS	
การทดสอบ <i>Salmonella</i> spp.		การพัฒนาและทดสอบ	58 : 4 : 283-292
ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์		ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	
อาหารโดยใช้ผลการทดสอบความชำนาญ		ยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต ด้วยวิธี UPLC	

- การวัดปริมาณรังสีเฉลี่ย 58:1:33-38
ที่ต่อมน้ำนมจากการเอกซเรย์
เต้านมในโรงพยาบาลเขตภาคกลาง
ในประเทศไทย
- การศึกษาคุณภาพของ 58:1:1-17
เมล็ดข่อยแห้ง
- การศึกษาคุณภาพของหัวตองตึง 58:4:270-282
- การศึกษาฤทธิ์คงทนของ 58:3:161-168
ทรายอะเบทในการควบคุม
ลูกน้ำยุงลายบ้าน *Aedes aegypti*
ในสภาพธรรมชาติและกึ่งจำลอง
ธรรมชาติ
- การหาสภาวะที่เหมาะสม 58:4:257-269
ในการนำพลาสติดเข้าสู่เซลล์
เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอล
แอนติบอดีต่อเอนไซม์แลคเตส
ดีไฮโดรจีเนสของพลาสโมเดียม
ฟัลซิพารัมในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
- ค**
- คุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย 58:2:73-79
ใน 6 จังหวัด ภาคกลางของ
ประเทศไทย ระหว่างปี
งบประมาณ 2556-2557
- คุณภาพยาเม็ดอะม็อกซิซิลลิน 58:1:17-32
และคลาวูลานิกแอซิด
ในประเทศไทย
- คุณลักษณะของอุปกรณ์วัดรังสี 58:3:141-148
ไอเอสแอลชนิด นาโนดอท
สำหรับงานรังสีวินิจฉัย
- ผ**
- ผลการพัฒนาห้องปฏิบัติการ 58:3:180-189
รังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาล
สังกัดกระทรวงสาธารณสุข
ในเขตสุขภาพที่ 9
- ว**
- วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอล 58:2:108-119
โพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์
เครื่องสำอาง โดยวิธี
ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด
โครมาโทกราฟี

TITLE INDEX

Bull Dept Med Sci 58 (1-4) 2016

- | | |
|--|---|
| C | Improvement of Quality 58 : 2: 120-129 |
| Capacity Building for In Vitro 58 : 4: 58-56 | System in Laboratory Network of |
| Diagnostic Laboratory with | the Region 7 Health Service |
| Requirement of ISO/IEC 17025:2005 | |
| Characterization of an Optically 58 : 3: 141-148 | L |
| Stimulated Luminescence NanoDot | Laboratory Accreditation 58 : 4: 59-07 |
| for Diagnostic Radiology | According to MOPH Standard |
| | Laboratory performance 58 : 3: 189-197 |
| | Assessment of <i>Salmonella</i> spp. |
| | in a food Microbiology |
| | Proficiency Testing Scheme |
| D | M |
| Detection of Norovirus in 58 : 1: 39-49 | Method Development and 58 : 4: 229-245 |
| Raw Oyster Meat by | Validation for Analysis |
| Using Real time Reverse | of Dioxins, Dioxin-like PCBs |
| Transcription-Polymerase | and Non dioxin-like PCBs |
| Chain Reaction (real time RT-PCR) | in Milk Powder by HRGC/HRMS |
| Determination of Clobetasol 58 : 2: 108-119 | Method Validation for Potency 58 : 3: 169-179 |
| Propionate in Cosmetic Products | Test of Human Tetanus |
| by High Performance Liquid | Immunoglobulin by Commercial Test Kit |
| Chromatography | |
| Determination of Residual 58 : 3: 149-160 | P |
| Vero Cell DNA in Viral Vaccine | Performance of Microhematocrit 58 : 4: 59-03 |
| Products by Real-time PCR | centrifuge in the primary care |
| Development for Radiation 58 : 3: 180-189 | units in Phitsanulok Province |
| Diagnostic Laboratory | Primary Skin Irritation Test 58 : 2: 130-140 |
| in the Hospitals Under | in Laboratory Animals for Health Products |
| the Ministry of Public Health | |
| in Health Regional 9 | Q |
| | Quality of Amoxicillin and 58 : 1: 17-33 |
| I | Clavulanic Acid Tablets in Thailand |
| Identification of a Newfound 58 : 3: 208-220 | Quality of Diagnostic x-ray 58 : 2: 73-79 |
| Sedative Drug of Abuse | Units in 6 Provinces of Central |
| in Thailand: Phenazepam | Part of Thailand During 2013-2014 |
| in Seized Material | |
| Implementation of Document 58 : 1: 61-71 | |
| Control Information System (DOC-IS) | |

Quality Study of Dried 58 : 4: 270-282

Dong-Dueng Tuber
(*Gloriosa superba* Linn.)

Quality Study of Dried 58 : 1: 1-16

Koi Seed (*Streblus asper* Lour.)

S

Simultaneously Quantitative 58 : 2: 93-107

of Phthalates in Health Care
Products by UPLC/DAD

Surveillance of Vibrio 58: 2: 80-92

parahaemolyticus, *Staphylococcus*
aureus and *Salmonella* spp.
in Boiled Crab Meat

Survey of Mean Glandular 58 : 1: 33-39

in Mammography Practice
in Hospitals in Central Region
of Thailand

Survey of *Listeria* 58 : 3: 197-207

Monocytogenes,
Salmonellae และ *E.coli* O157: H7
Contamination in Raw Meats from
Fresh Markets in Bangkok
and Circumferences

T

The Development of 58 : 1: 49-60

Medical Laboratory

Quality System of the Hospital

in Health Area 2 Comply with
to ISO 15189 to Comply

The Persistence of Temephos

(Abate) on *Aedes aegypti*

L. Larvae Under Field and Simulated

Conditions with to ISO 18189

to ISO 15189

The Persistence of Temephos

(Abate) on *Aedes aegypti*

L. Larvae Under Field and

Simulated Conditions

Transfection Optimization for 58 : 4: 252-269

Expression of the Recombinant

Monoclonal Antibody Against

Plasmodium Falciparum Lactate

Dehydrogenase in Mammalian Cells

U

UPLC Method Development 58 : 4: 283-292

and Validation for Determination

of Timolol maleate

in Ophthalmic Solution



ใบสมัครเป็นสมาชิก วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

ต้องการรับ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เวลา 1 ปี (4 ฉบับ) เป็นเงิน 200.- บาท

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง

☐ ธนาณัติ

☐ ตัวแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

ส่งจ่าย

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบำรุงราศนราดูล ถนนติวานนท์

นนทบุรี 11000 โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

ส่งจ่าย ปณ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

คำขอบคุณ

คณะบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณท่านผู้สละเวลาอันมีค่ากรุณาตรวจแก้ผลงาน
ที่ตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 58 ฉบับที่ 1-4 พ.ศ. 2559 ดังมีรายนามต่อไปนี้

รศ.ศรีสนิธ อินทรมณี

ศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

ภญ.สุภัทรา อิ่มเอิบ

นายปรีชา จิ่งสมานกุล

นางนภาพร อนันตสินกุล

นายอรัญ ทนันทิ

นายทรงพล ชีวะพัฒน์

ภญ.ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา

ดร.นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา

นางศิริวรรณ บุญรัตน์

นางสาวสดุดี รัตนจรัสโรจน์

นางรสนา อริยกุลนิมิตร

นายปนิสก์ วนิชชานนท์

นางสาวจินดา ทองเรือง

ศ.ดร.ไพโรจน์ พุฒินะ

ดร.นวลตา ม่วงน้อยเจริญ

ดร.จงดี้ ว่องพินัยรัตน์

นางนันทนา สิทธิชัย

นางชมโฉล สันธสาร

ภญ.เย็นจิตร เตชะดำรงสิน

ดร.ภัทรวีร์ สร้อยสังวาลย์

ภญ.สุรัชณี เศวตศิลา

นางสุดธิดา หมีทอง

ดร.สุภาพร ภูมิอมร

นางสาววารุณี จิรวัดนาพงศ์

นายธรรมรัตน์ บุญสูง

นางสาวนภวรรณ เจนใจ

นายสาโรช ปรียาชาติ

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Apichai Mongkol	Jureporn Boonyawongvirot
	Varunee Jinaratana	Phichet Banyati
Technical Advisor	Prasert Thongcharoen	Panadda Silva
	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Jongdee Wongpinairat	Pimjai Naigowit
	Supatra Im-Erb	Sumol Pavittranon
Editor	Teeranart Jivapaisarnpong	
Assistant Editor	Laojana Chowanadisai	
Editorial Board	Prasert Auewarakul	Orasa Suthienkul
	Pilaipan Puthavathana	Punnee Pitisuttithum
	Pintip Pongpech	Suchada Chaisawadi
	Danai Tiwawech	Suwanna Charunut
	Hansa Chaivanit	Pathom Sawanpanyalert
	Duanthanorm Promkhatkaew	Punthip Teeyapant
	Salakchit Chutipongvivate	Usavadee Thavara
	Busarawan Sriwanthana	Siri Srimanoroth
	Kanokporn Atisook	Wichuda Jariyapan
	Supanee Duangteraprecha	
Administration	Namfon Noiprasert	
	Prasan Julwong	
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Aroonkarnphim Ltd., Part.	
	457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200	
	Tel. 0-2282-6033-4	



มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย ฉบับบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th